

**UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS-UFR SCIENCES**

***ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE***

**ED 85**

**Thèse de doctorat**

Pour l'obtention du grade de **Docteur en Sciences**  
Spécialité : Génétique, Développement et Immunité

Soutenue le 29 octobre 2013

Par

**Sanda Mimouna**

***E. coli* adhérentes et invasives et pathogenèse de la maladie de Crohn :  
Rôle du facteur hypoxique HIF-1**

**Composition du jury :**

**Dr E. Lemichez  
Dr L. Espert  
Dr C. Peyssonnaud  
Dr V. Vouret-Craviari**

**Président  
Rapportrice  
Rapportrice  
Directrice de thèse**

*« Aux deux personnes sans lesquelles je ne serais pas là aujourd'hui, ceci est d'une grande part votre accomplissement, si il y a une chose dont je suis fière c'est d'être votre enfant »*

## REMERCIEMENTS

*En premier lieu, je tiens à remercier les docteurs Lucile Espert et Carole Peyssonaux d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et de siéger au jury. Je voudrais également remercier le Dr Emmanuel Lemichez d'avoir accepté la présidence de ce jury.*

*Valérie, je tiens à te remercier pour m'avoir encadrée et dirigée durant l'épreuve et aventure qu'ont été cette thèse. Les échanges scientifiques que nous avons pu avoir ainsi que les difficultés techniques rencontrées m'ont permis de « grandir » scientifiquement et de prendre confiance en moi. Pour cela, pour la patience, la compréhension dont tu as fait preuve envers moi, ainsi que pour ton soutien sans faille depuis ma première année de master et pendant les trois années de thèse, merci. Tu as été pour moi un exemple de dur labeur, de persévérance et de passion sans laquelle je pense que notre travail n'aurait pas de sens.*

*Je tiens également à remercier le Pr Paul Hofman qui m'a accueilli au sein de son équipe et laboratoire.*

*J'ai eu la chance de côtoyer les membres d'une excellente équipe aux qualités humaines inoubliables qui sont devenus plus des amis que des collègues de travail.*

*Je commence par celui qui a supporté mes long discours philosophiques de bon matin, qui a maintes fois « sauvé mes tubes », qui m'a soutenue pendant les bonnes et mauvaises périodes par son écoute, sa zen attitude et sa générosité d'actes et de pensées, Amine alias « Aminator ». Tu passes finalement ta thèse après moi, moi qui craignais te voir partir avant, je te souhaite de la mener au mieux, de réussir dans tout tes projets d'avenir et de rester fidèle à toi-même car des gentlemen comme toi y en a vraiment plus beaucoup !*

*Bam tu es la dose de bonne humeur du labo qu'il pleuve ou qu'il vente, je t'ai rarement vu faire la tête ou être maussade. C'est avec le même sourire remplie de sollicitude que tu conseille et guide quiconque te demande de l'aide. Tu transmets ta joie de vivre, ton courage et ta motivation à tous même dans tes moments difficiles. Pour tes précieux conseils, ton temps accordé et toutes ces discussions animées, merci.*

*Pat, je ne sais pas comment je vais affronter des séquences nucléotidiques ou un programme de PC récalcitrants dans le futur sans pouvoir t'appeler au secours ! Je ne me souviens pas t'avoir vu refuser un coup de main ou un dépannage café non plus pendant ces trois dernières années. Je te remercie pour tout et je te souhaite plus de « Nature » et de réussite dans le futur.*

*Ma Zoïe !! Tu es arrivée plus tard au labo et je me souviens encore du début où il a fallu gagner la confiance de cette jeune femme timide pour briser sa carapace. L'effort en valait la peine car c'est une adorable personne sensible, drôle et attachante que j'ai eu la chance d'avoir comme amie par la suite. Continue à bosser dur, ne renonce pas à tes rêves et surtout ai confiance tu as tout pour réussir ! Nos petites confidences vont vraiment me manquer.*

*Titou, merci pour les explications concernant le monde des souris, pour les cellules « babysitté » en mon absence et les coups de mains paillasse !*

*Je veux remercier aussi ceux qui ne sont plus dans l'équipe et que j'ai eu la plaisir de rencontrer en son sein : Abdou, même si j'ai eu du mal à suivre les explications grands gels à un moment donné.*

*Annabelle, qui a pris le temps de répondre à mes questions d'étudiante en Master encore pas très rassurée par la perspective d'une thèse. Merci aussi pour la technique de dosage de protéines.*

*Diogopito alias « papounet » selon Baharia et qui ne s'est jamais au grand jamais énervé contre moi et auquel je discernerais bien le prix du mec le plus cool sur terre. Je te souhaite de réaliser toutes tes ambitions et de garder ton énorme sourire lumineux.*

*Mais aussi Gaëlle, Marius, ainsi que les étudiants de passage : Sylvia, Nicolas, Hussein avec qui j'ai partagé des bons moments de complicités même en dehors du laboratoire. Ceux qui ont contribué beaucoup à mon projet comme Diogo et un peu comme Thibault et Laure line.*

*Tous les membres de l'équipe du bâtiment J et plus particulièrement Virginie, Olivier et Mireille pour les qPCR, les cytopins et les images de ME.*

*Ma Selma !! qui reste ma plus belle rencontre dans cette tour à qui je dois une tonne de faveurs que si je commençais à les lister je n'en finirais pas. Parmi elles, le sommaire de ce manuscrit mais plus important ton amitié, ton soutien à toutes épreuves et ta grandeur d'âme et de cœur. Mansour, que dire de plus à part que tu es le meilleur et que tu as souvent raison.*

*Les membres des autres équipes qui ont eu la gentillesse de me dépanner en matériel ou méthode et qui sont devenus des amis: Alain Medawar, Mickael Ohanna, Momo Fareh, David Debruyne et toute l'équipe de Thierry Virolle. Mais aussi Ibtissam, Tanesha, Sébastien, Clément, Jocelyn et toutes les personnes avec qui j'ai été en contact à la tour Pasteur ou au Centre Antoine Lacassagne.*

*Merci à Mireille Cormont pour avoir pris le temps de nous donner son avis avisé concernant la partie xénophagie.*

*Merci à Franck Lafont pour son expertise des images de ME.*

*Je tiens à remercier fortement Infectiopôle Sud qui a financé mes trois années de thèse. Sans oublier la Faculté des sciences de Nice et les autres organismes qui ont contribué au financement du projet.*

*Pour finir, merci aux membres de ma famille dont Moumoun et Mohamed Hedi, mes amies Hanin et Wafa ainsi qu'à toute personne ayant contribué de près ou de loin ne serait-ce que par une once d'encouragement à la réalisation de ce manuscrit car chaque geste et parole compte.*

*Merci à toi Hussein Zeineddine pour la motivation que tu as su m'insuffler tout le long de l'écriture de ce mémoire.*



# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	3
SOMMAIRE.....	5
LISTE DES FIGURES .....	7
LISTE DES ABREVIATIONS .....	8
RESUME .....	10
INTRODUCTION .....	13
<b>1 LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES -----</b>	<b>13</b>
1.1 DEFINITION : .....	13
1.1.1 Epidémiologie .....	13
1.1.2 Symptômes : .....	15
1.2 PATHOGENESE DES MICI .....	16
1.2.1 Facteurs génétiques : .....	16
1.2.2 Facteurs environnementaux.....	21
1.3 INFLAMMATION .....	30
1.3.1 Inflammation physiologique .....	30
1.3.2 Inflammation pathophysiologique : .....	33
<b>2 HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR 1 ALPHA (HIF-1ALPHA): -----</b>	<b>35</b>
2.1 GENERALITES: .....	35
2.1.1 Facteur de transcription.....	37
2.1.2 Régulation: .....	39
2.2 FONCTIONS CELLULAIRES REGULEES PAR HIF:.....	46
2.2.1 HIF et inflammation.....	48
2.2.2 HIF et angiogenèse: .....	49
2.2.3 HIF et autophagie: .....	49
<b>3 ESCHERICHIA COLI ENTEROPATHOGENES : -----</b>	<b>51</b>
3.1 ENTEROBACTERIES:.....	51
3.1.1 E. coli commensales : .....	52
3.1.2 E. coli entéropathogenes: .....	52
3.2 LES E COLI ADHERENTES ET INVASIVES (AIEC) : .....	56
3.2.1 Facteurs bactériens.....	56
3.2.2 Facteurs cellulaires .....	58
3.2.3 AIEC et MICI.....	60
<b>4 MECANISMES DE DEFENSES DE L'HOTE :-----</b>	<b>61</b>
4.1 INTERNALISATION DE MATERIEL EXTRACELLULAIRE:.....	61
4.1.1 Endocytose : .....	61
4.1.2 Phagocytose : .....	63
4.2 AUTOPHAGIE:.....	65
4.2.1 définition : .....	65
4.2.2 machinerie autophagique : .....	66
4.3 XENOPHAGIE.....	70
4.3.1 ciblage xenophagique : .....	72
4.4 LES MECANISMES D'ÉCHAPPEMENT : .....	75
4.4.1 Stratégies d'évitement : .....	75
4.4.2 strategies de detournement:.....	76
RESULTATS .....	81
INTRODUCTION PAPIER 1 .....	81
CONCLUSION ET PERSPECTIVES PAPIER 1 .....	83

INTRODUCTION PAPIER 2 .....	88
DISCUSSION PAPIER 2 .....	90
PERSPECTIVES PAPIER 2.....	94
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	96
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	101

# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : CARTE GLOBALE DES MICI .....	14
FIGURE 2 : LOCALISATION DES LESIONS INTESTINALES DANS LA MC ET LA RCHU .....	15
FIGURE 3 : MODELE DE PATHOGENESE DES MICI BASE SUR DES GWA.....	20
FIGURE 4 : LES DIFFERENTS TLRs, LEURS LIGANDS RESPECTIFS AINSI QUE LES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES.....	24
FIGURE 5 : ROLE DE CARD9 ET NOD2 DANS LA REPONSE AUX MICROBES .....	25
FIGURE 6 : IMPLICATION DU MICROBIOTE DANS LES MICI .....	28
FIGURE 7 : LES CELLULES IMMUNITAIRES ET LEURS PRECURSEURS .....	30
FIGURE 8 : VOIES MYD88 DEPENDANTE ET INDEPENDANTE TLRs ET NLRs.....	32
FIGURE 9 : DESEQUILIBRE DE L'HOMÉOSTASIE INTESTINALE .....	34
FIGURE 10 : L'EXPERIENCE DE PRIESTLEY.....	36
FIGURE 11 : GRADIENT D'OXYGENATION DE LA MUQUEUSE INTESTINALE. ....	37
FIGURE 12 : STRUCTURE DES SOUS UNITES HIF HUMAINS. ....	38
FIGURE 13 : ELEMENTS CLE DE LA REGULATION DE HIF EN NORMOXIE ET EN HYPOXIE .....	40
FIGURE 14 : REGULATION DE HIF PAR LES ROS .....	42
FIGURE 15 : INDUCTION DE HIF-1A EN REPONSE AU LPS. ....	46
FIGURE 16 : GENES REGULES PAR HIF ET PROCESSUS CELLULAIRES ASSOCIES.....	47
FIGURE 17 : MODELE D'INDUCTION DE L'AUTOPHAGIE PAR HIF-1 .....	50
FIGURE 18 : LES ANTIGENES ENTEROBACTERIENS.....	51
FIGURE 19 : ASPECT HISTOPATHOLOGIQUE DES LESIONS A/E .....	54
FIGURE 20 : STRATEGIES D'ADHERENCE DES EPEC ET EHEC.....	55
FIGURE 21 : STRATEGIE INVASIVE DES EIEC .....	56
FIGURE 22 : <i>E. COLI</i> K12 A DROITE VERSUS AIEC LF82 A GAUCHE. ....	58
FIGURE 23 : LES TROIS TYPES D'ENDOCYTOSE .....	62
FIGURE 24 : LES DIFFERENTES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA MATURATION DU PHAGOSOME ET DE L'ENDOSOME .....	64
FIGURE 25 : LES TROIS TYPES D'AUTOPHAGIES .....	66
FIGURE 26 : AUTOPHAGIE ET AUTOPHAGOSOME FORMATION. ....	68
FIGURE 27 : V-ATPASE ET SES SOUS UNITE.....	69
FIGURE 28 : LES RECEPTEURS CELLULAIRES INDUCTEURS DE LA XENOPHAGIE.....	70
FIGURE 29 : INFLUENCE DES MUTATIONS ASSOCIEES A LA MC SUR LE PROCESSUS XENOPHAGIQUE .....	71
FIGURE 30 : RECONNAISSANCE AUTOPHAGIQUE DES BACTERIES.....	73
FIGURE 31 : LA LC3-ASSOCIATED-PHAGOCYTOSE, IMPLICATION DE LC3 INDEPENDANTE DE L'AUTOPHAGIE .....	74
FIGURE 31 : MANIPULATION MICROBIENNES DE L'AUTOPHAGIE.....	77

## LISTE DES ABREVIATIONS

**AGFR2** = Anterior gradient protein 2  
**AIEC** = *Escherichia.coli* Adhérentes et Invasives  
**ARNT** = Aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator  
**ATG** = Autophagy Related Genes  
**BNIP3** = BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3  
**CAC** = Cancer Colorectal  
**CSF** = Colony-stimulating factor  
**DAEC** = Diffusely Adhering *E.coli*  
**DAMP** = Danger-associated molecular patterns  
**DSS** = Dextran Sodium Sulfate  
**ECAD** = *E.coli* à adésion diffuse  
**ECEAgg** = *E.coli* entéroaggrégatives  
**ECEI** = *E.coli* Entéroinvasives  
**ECEH** = *E.coli* entérohémorragiques  
**ECET** = *E.coli* entérotoxigénique  
**EGF** = Epidermal Growth Factor  
**EOPS** = Exempt d'Organisme Pathogène spécifique  
**EPEC** = *E.coli* entéropathogènes  
**ExPEC** = *E.coli* extra-intestinales  
**GWA** = Genome Wide association  
**HDAC** = Histones Désacétylases  
**HDL** = High-density lipoproteins  
**HIF-1 $\alpha$**  = Hypoxia Inducible Factor 1 alpha  
**HRE** = Hypoxia Response Element  
**HSP90** = Heat shock protein 90  
**IFN** = Interféron  
**IL** = Interleukines  
**IRAK** = IL-1 Associated Kinase  
**IRF3** = Interferon Regulatory Factor 3  
**LAMP** = Lysosome Associated Membrane Proteins  
**LC3** = microtubule-associated protein 1 Light Chain 3  
**LPS** = Lipopolysaccharide  
**MAPK** = Mitogen Activated Protein Kinase  
**MC** = Maladie de Crohn  
**MICI** = Maladie Inflammatoires Chroniques Intestinales  
**MMP** = Metalloproteinases  
**MR** = Mannose récepteur  
**MTX** = Metothrexate  
**MyD88** = Myeloid Differentiation primary response gene 88

**NADPH** = Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase  
**NFKB** = Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
**NK** = Natural Killer  
**NO** = Oxyde nitrique  
**NOD** = Nucleotide-binding Oligomerization Domain récepteur  
**ODD** = Oxygen Dependent Domain  
**OMV** = Outer Membrane Vesicle  
**PAMP** = Pathogen-Associated Molecular Patterns  
**PAS** = Per Arnt Sim  
**PE** = Phosphatidyléthanolamine  
**PHD** = Prolyl hydroxylases  
**PRR** = Pattern Recognition Receptors  
**pVHL** = protéine Von-Hippel-Lindau  
**p62/SQSTM 1** = Sequestrosome 1  
**RCUH** = RectoColite Ulcéro-Hémorragique  
**RE** = Réticulum Endoplasmique  
**RIG-1** = Retinoid Inducible Gene 1  
**RIPK2/RICK** = Receptor Interacting Protein Kinase 2  
**ROS** = Reactive Oxygen Species  
**RLR** = RIG Like Receptors  
**SCV** = Salmonella Containing Vacuole  
**SOD** = SuperOxide Dismutase  
**SR** = Récepteurs Scavengers  
**STEAE**C = Shiga Toxin producing Enteroaggregative *E. coli*  
**Stx** = Shiga toxin  
**TAD** = Domaines de transactivation  
**TGF** = Transforming Growth Factors  
**TIR** = Translocated Intimin Receptor  
**TLR** = Toll Like Receptor  
**TNF- $\alpha$**  = Tumor Necrosis factor alpha  
**TNF** = Tumor necrosis factor  
**TRAF6** = TNF-receptor Associated Factor 6  
**TRIF** = TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$   
**T3SS** = Type III Secretion System  
**VEGF** = Vascular Epithelial Growth Factor

## RESUME

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI). Son incidence et sa prévalence ont augmenté en Europe au cours des dix dernières années (150 pour 100000 habitants) constituant ainsi un problème de santé majeur. L'inflammation chronique dans la MC favorise la mise en place d'une angiogenèse pathophysiologique. Inflammation et angiogenèse sont deux réponses cellulaires suspectées dans la survenue des cancers coliques associés au MICI. Même si les facteurs favorisant la mise en place de la MC restent non élucidés, la contribution des bactéries exogènes est fortement suspectée. Parmi ces bactéries, les *E.coli* adhérentes et invasives (AIEC), isolées à partir de la muqueuse iléale de patients porteurs de la MC, sont un bon candidat.

Les objectifs de mon projet de thèse étaient de caractériser les mécanismes moléculaires induits par les AIEC et impliqués dans la mise en place des réponses pro inflammatoire et pro angiogénique des cellules intestinales épithéliales.

Le facteur de transcription hypoxique (HIF-1) est au cœur de l'immunité innée et de l'angiogenèse. J'ai émis l'hypothèse que les AIEC pouvaient moduler le niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  et ainsi contrôler les réponses pro inflammatoire et pro angiogénique. Dans mon premier article, j'ai montré que HIF-1 $\alpha$  est maximalelement exprimé au niveau de l'épithélium iléal des patients porteurs de la MC. Ensuite, j'ai montré sur un modèle murin compétent pour l'infection par les AIEC, les souris CEABAC10, que les bactéries induisent l'augmentation du niveau protéique de HIF-1  $\alpha$  ainsi que l'activation de la voie de signalisation du VEGF, le facteur angiogénique le plus puissant.

Enfin, l'utilisation de cellules intestinales épithéliales invalidées pour l'expression de HIF-1  $\alpha$ , les cellules T84-Shhif1  $\alpha$ , m'a permis de démontrer le rôle crucial de HIF-1 dans la production des facteurs pro angiogénique et pro inflammatoire.

Des études ont montré que la xénophagie, une autophagie dédiée à la dégradation des bactéries intracellulaires, est impliquée dans la dégradation des AIEC. HIF-1 ayant été décrit comme un inducteur de l'autophagie, j'ai émis l'hypothèse que ce facteur participe aux mécanismes xénophagiques. Dans un premier temps, j'ai montré que les AIEC survivent deux fois mieux dans les cellules T84-Shhif1 $\alpha$ . De façon intéressante, j'ai observé le même taux de survie dans des cellules dépourvues d'ATG5 et de p62, deux protéines clés du processus autophagique ce qui suggère que HIF-1 participe à la xénophagie. Ensuite, j'ai montré que dans les cellules T84-Shhif1 $\alpha$  le flux xénophagique est bloqué et que les AIEC restent associées à des structures marquées uniquement par LC3-II alors que dans les cellules contrôles les AIEC co-localisent avec LC3-II et LAMP-1. Cette co-localisation indique un adressage des bactéries aux autophagolysosomes, adressage défectueux dans les cellules dépourvues de HIF-1 $\alpha$ . Pour identifier des gènes impliqués dans l'activité lysosomale et sous le contrôle de HIF-1 $\alpha$  nous avons réalisé une analyse transcriptomique à partir des cellules T84shhif-1 $\alpha$  et T84shctr infectées par les AIEC. Parmi les 15 gènes les plus différentiellement régulés nous avons ciblé (1) les gènes sous exprimés dans les cellules dépourvues de HIF-1 $\alpha$  et (2) les gènes impliqués dans le processus de dégradation lysosomale. Parmi ces gènes, la sous unité G3 de la V-ATPase (régulation du pH intralysosomal) et les cathepsines-2, -a et -L1 ont plus particulièrement attiré notre attention. Nous sommes actuellement en train de confirmer ces résultats (expression des gènes par qPCR et protéines) afin d'identifier une cible qui sera alors testée dans les cellules T84 infectées par les AIEC.

En conclusion, mon travail de thèse a mis en évidence d'une part un rôle crucial des AIEC dans la mise en place des désordres inflammatoires du tube digestif et d'autre part la contribution majeure du facteur de transcription HIF-1 dans la réponse aux AIEC.

# *Introduction*



# INTRODUCTION

## *1 Les Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales*

### 1.1 DÉFINITION :

Les maladies Inflammatoires chroniques intestinales ou MICI sont des troubles inflammatoires qui affectent la totalité du tractus digestif. Ces maladies regroupent principalement la Maladie de Crohn (MC) et la recto-colite ulcéro-hémorragique (RCUH). Cependant dans environ 5% des cas il est impossible de déterminer catégoriquement s'il s'agit d'une MC ou d'une RCUH, ces maladies sont alors classées dans le groupe des « colites indéterminées »<sup>[1]</sup>.

#### 1.1.1 EPIDÉMIOLOGIE

Les MICI se déclarent généralement chez des personnes dont la tranche d'âge varie entre 20 et 40 ans. Elles peuvent néanmoins apparaître chez des adolescents ou des personnes âgées, voir même très âgées (un cas de MICI a récemment été diagnostiqué chez un vieil homme de 91 ans <sup>[2]</sup>). Ainsi, en général, les patients MICI sont affectés pendant leur période de vie la plus productive. De ce fait, ces pathologies induisent des dépenses à long terme, que ce soit pour le patient, le système sanitaire et la société.

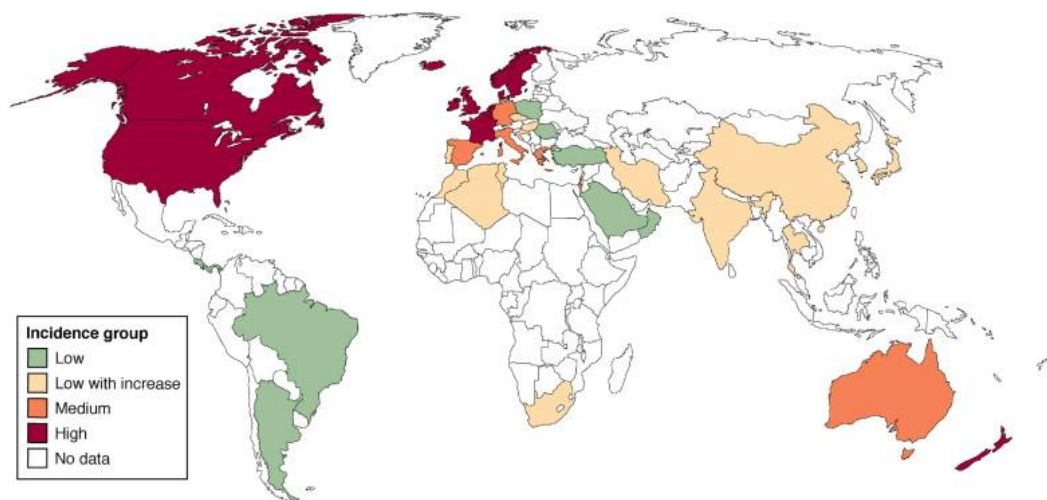
L'apparition des MICI est un processus mondial continu et dynamique qui représente un réel fardeau pour certains pays en voies de développement mais aussi pour les pays industrialisés. Il est difficile d'évaluer précisément l'incidence des MICI mais elle semble suivre un gradient nord-sud. Ce gradient est retrouvé dans les pays industrialisés.

Comme indiqué dans la **Figure 1**, une étude comparative de toutes les revues et articles qui traitent l'épidémiologie des MICI démontre que l'incidence ainsi que la prévalence les plus élevées de ces pathologies ont été enregistrées dans les régions occidentalisées <sup>[3]</sup>.

Conformément à cela, une étude du Comité de l'organisation Européenne Epidémiologique de Crohn et de la Colite (ECCO-EpiCom) a démontré, que la prévalence des MICI en Europe est en augmentation continue et qu'elle a atteint les 2,5-3 millions de personnes en 2010. De plus, l'incidence la plus forte de MICI a été reportée aux îles Faeroe (81.5 pour 100000 habitants) [4]. La dernière étude publiée en France démontre que l'incidence de la MC s'élève à 8.2 et celle de la RCUH à 7.2 pour 100000 habitants avec un gradient nord-sud clairement établi pour la MC mais pas pour la RCHU [5].

**Figure 1 : Carte globale des MICI**

[6]



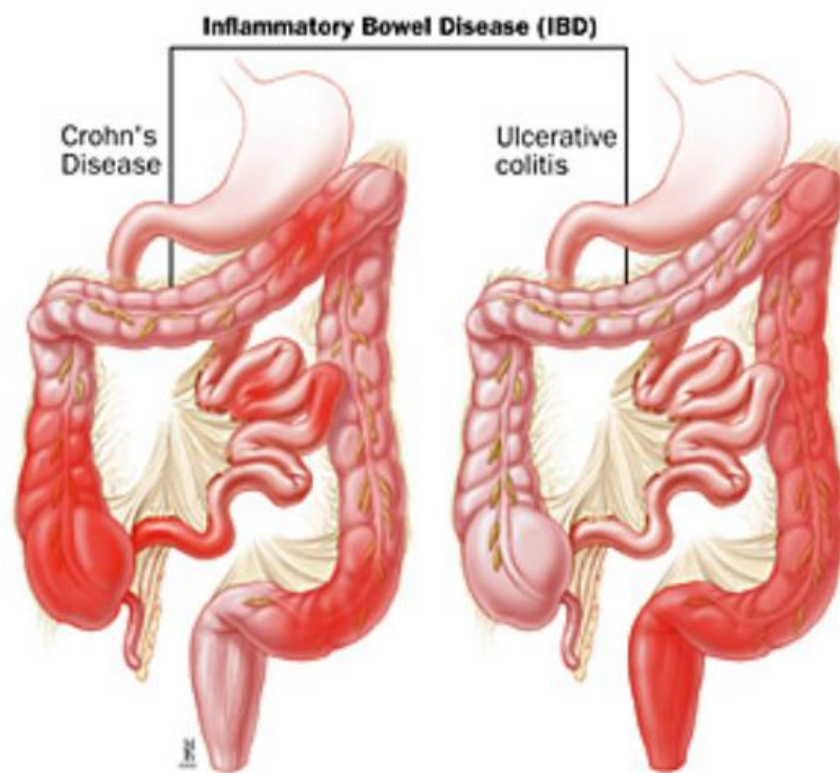
*Les zones en rouge indiquent une incidence annuelle plus élevée que  $10/10^5$ , les zones en vert indiquent une incidence inférieure à  $4/10^5$ , les zones en jaune indiquent une incidence faible en augmentation continue et l'absence de couleur signifie qu'il n'y a pas eu de recensement d'incidence de MICI pour ces zones.*

### 1.1.2 SYMPTÔMES :

Généralement, la manifestation des MICI dépend de la zone intestinale affectée, les symptômes en revanche ne sont pas spécifiques de cette maladie. Les lésions observées chez les patients MC sont intermittentes et atteignent principalement la région iléo-colique mais peuvent toucher tout le tube digestif de la bouche à l'anus. En revanche, les lésions observées chez des patients RCHU s'étendent de manière continue sans intervalle sur une portion plus ou moins importante du rectum et du colon (**Figure2**).

**Figure 2 : Localisation des lésions intestinales dans la MC et la RCHU**

*[D'après The Johns Hopkins Medical Institution. Gastroenterology & Hepatology center]*



*Sur ce schéma représentatif du tractus digestif de deux individus souffrant respectivement de la MC (à gauche) et de la RCHU (à droite), les lésions sont représentées en rouge. Les lésions MC sont de nature intermittente et peuvent atteindre l'ensemble du tractus intestinal alors que les lésions RCHU se limitent à la région du rectum et du colon.*

Les symptômes des MICI sont des douleurs abdominales, de la diarrhée, de la fatigue, un amaigrissement et un état subfébrile.

Deux phases sont caractéristiques de ces maladies :

- une phase d'activité inflammatoire aigue appelée « poussée » dont la violence et la durée varient selon les patients.

- une phase de rémission qui alterne avec la phase de poussée.

## 1.2 PATHOGÉNÈSE DES MICI

Les MICI sont des pathologies multifactorielles à étiologie encore vaguement déterminée même si l'implication de facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux a été démontrée par de nombreuses études ces dix dernières années. La complexité de ces maladies, ainsi que leur origine multifactorielle, constitue un défi pour leur caractérisation du point de vue moléculaire. Cependant, d'un point de vue histologique, les MICI sont décrites comme une inflammation chronique accompagnée d'une infiltration massive de leucocytes au niveau de la muqueuse intestinale. Il est donc largement accepté que le développement de ces pathologies est le résultat d'une réponse inflammatoire exagérée.

### 1.2.1 FACTEURS GÉNÉTIQUES :

Des études menées sur des cohortes de jumeaux monozygotes (MZ) et dizygotes (DZ) ont permis d'incriminer la composante génétique héréditaire dans la mise en place des MICI. La concordance (c'est-à-dire le pourcentage de paires de jumeaux porteurs de la même maladie) d'une maladie d'origine purement génétique est de 100% chez des jumeaux MZ et de 50% chez des jumeaux DZ. En ce qui concerne la MC la concordance est de 40% alors qu'elle est de 8% seulement pour la RCHU chez des jumeaux MZ. Elle est en revanche nulle chez les jumeaux DZ concernant les deux maladies [<sup>7</sup>;<sup>8</sup>]

Des familles comprenant des membres ayant une MICI ont un risque plus élevé de développer la même maladie. Le risque le plus élevé concerne les parents de premiers degrés et il est plus élevé chez des patients MC (2% à 14%) que chez ceux avec une RCHU (7% à 11%) [9]. Ceci démontre que parmi les MICI, seule la MC présente un facteur génétique fort mais néanmoins non exclusif.

Les MICI résultent donc en partie de mutations d'un ou plusieurs gènes (dit gènes de susceptibilités) qui sont transmises entre individus apparentés. Déjà en 2001, l'exemple le plus illustratif a été apporté par le gène de susceptibilité « Nuclear-binding Oligomerization Domain containing protein 2 » (NOD2, appelé aussi « Caspase Recruitment Domain containing protein 15 », CARD15) dont trois mutations (R702W, p.G908R et p.L1007fs situées dans la région « Leucine Rich Repeat » (LRR) codante du gène) ont été identifiées comme facteurs de risques chez des patients MC. Cependant, seul 50% des malades MC sont porteurs d'une de ces mutations ce qui prouve qu'elles ne sont ni nécessaires ni suffisantes au développement de la maladie [10,11].

Depuis, un grand pas dans la détermination des gènes impliqués dans la pathogenèse des MICI a été fait grâce aux études d'association par « Genome-Wide Association Study » (GWA). Ces études consistent à examiner plusieurs variants génétiques communs chez différents individus afin de déterminer si un de ces variants est associé à un trait particulier. Les GWA se focalisent sur les « Single Nucleotide Polymorphisme » SNP comme variants génétiques et les maladies comme traits [12,13].

Un (SNP) est une variation au niveau d'une séquence ADN qui se produit lorsqu'un seul nucléotide (A, T, C ou G) dans le génome est différent entre les membres d'une même espèce biologique ou entre deux chromosomes appartenant à la même paire. Par exemple, deux fragments d'ADN séquencés à partir d'individus différents, AAGCCTA à AAGCTTA contiennent une différence au niveau d'un nucléotide. Dans ce cas les deux séquences sont

appelées deux allèles et d'une manière générale, presque tous les SNPs communs ne possèdent que deux allèles différents. Les SNPs représentent 90% de la variabilité génétique entre les individus d'une même espèce et ils ne sont pas forcément reliés à des maladies [<sup>14</sup>].

Au cours de ces études, les SNPs d'un groupe d'individus malades et un groupe d'individus contrôles, sont comparés. La fréquence d'un allèle est estimée en fonction du pourcentage du nombre de copies de cet allèle particulier retrouvé dans une population par rapport au nombre de copies d'allèles totales du même gène. Si un allèle parmi ces SNPs est plus fréquent chez les patients, il est alors associé à la maladie. Ces SNPs associés sont ainsi considérés comme marqueurs d'une région du génome qui influence le risque de développer cette maladie.[<sup>13</sup>].

Concrètement, dans le cas de NOD2, les mutations identifiées s'avèrent être des SNPs ; SNP8, 12 et 13 qui correspondent respectivement aux mutations ponctuelles R702W, p.G908R et une insertion p.L1007fs. Economou et co auteurs ont démontré en 2004 sur une cohorte de patients caucasiens que le risque de développer une MC est deux fois plus élevé chez les individus porteurs du SNP8, trois fois plus élevé chez les porteurs du SNP13 et enfin 4 fois plus élevé chez des porteurs du SNP12. De plus, les auteurs ont mis en évidence un lien entre le nombre d'allèles de risque porté et la MC. En effet 8% à 17% des patients MC portent deux copies des allèles de risque comparés à moins de 1% parmi les individus caucasiens contrôles. Une seule copie d'allèle de risque est portée par 27% à 32% des patients étudiés comparés à 20% des contrôles de la même population. En conclusion, les patients homozygotes pour un variant ou porteurs de deux variants ont un risque plus élevé pour la MC que des patients hétérozygotes [<sup>15</sup>].

Les différentes études de GWA ont ainsi permis d'établir une carte de loci de susceptibilités reliée aux MICI. L'analyse de cette carte met en évidence plusieurs gènes et loci génétiques essentiels dans le maintien de l'homéostasie intestinale, incluant la fonction de barrière, la restitution épithéliale, la défense contre les microbes, la régulation de l'immunité innée et

adaptative, la génération des « Reactive Oxygen Species » (ROS), le stress du réticulum endoplasmique, l'autophagie et d'autres voies métaboliques associées à l'homéostasie cellulaire [16;17].

De manière intéressante, NOD2 code pour un récepteur intracellulaire impliqué dans la reconnaissance de composés de la paroi bactérienne (Lypopolysaccharide LPS, le Peptidoglycane PGN et le Muramyl DiPeptide MDP [18;19], dans l'activation de la voie NF-Kb et joue ainsi un rôle clé dans la réponse immunitaire face aux pathogènes. Son implication comme gène de susceptibilité pour la MC a établi le lien direct entre une altération génétique du système immunitaire et la mise en place de la MC [20;21].

Par la suite, plusieurs autres gènes de l'immunité ont été associés aux MICI. Parmi les plus importants :

- *CARD9* qui joue un rôle dans la reconnaissance de pathogènes et qui permet l'activation de certaines cytokines pro inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-23 et IL-6 ainsi que la cytokine anti inflammatoire IL-10 [22, 23].

- L'*ITLNI* connue aussi sous le nom d'Intelectin « Intestinal Lactoferrine Receptor », est un récepteur qui reconnaît les bactéries en plus de la lactoferrine (une protéine présentant une activité antibactérienne et fongicide présente dans le mucus) [16].

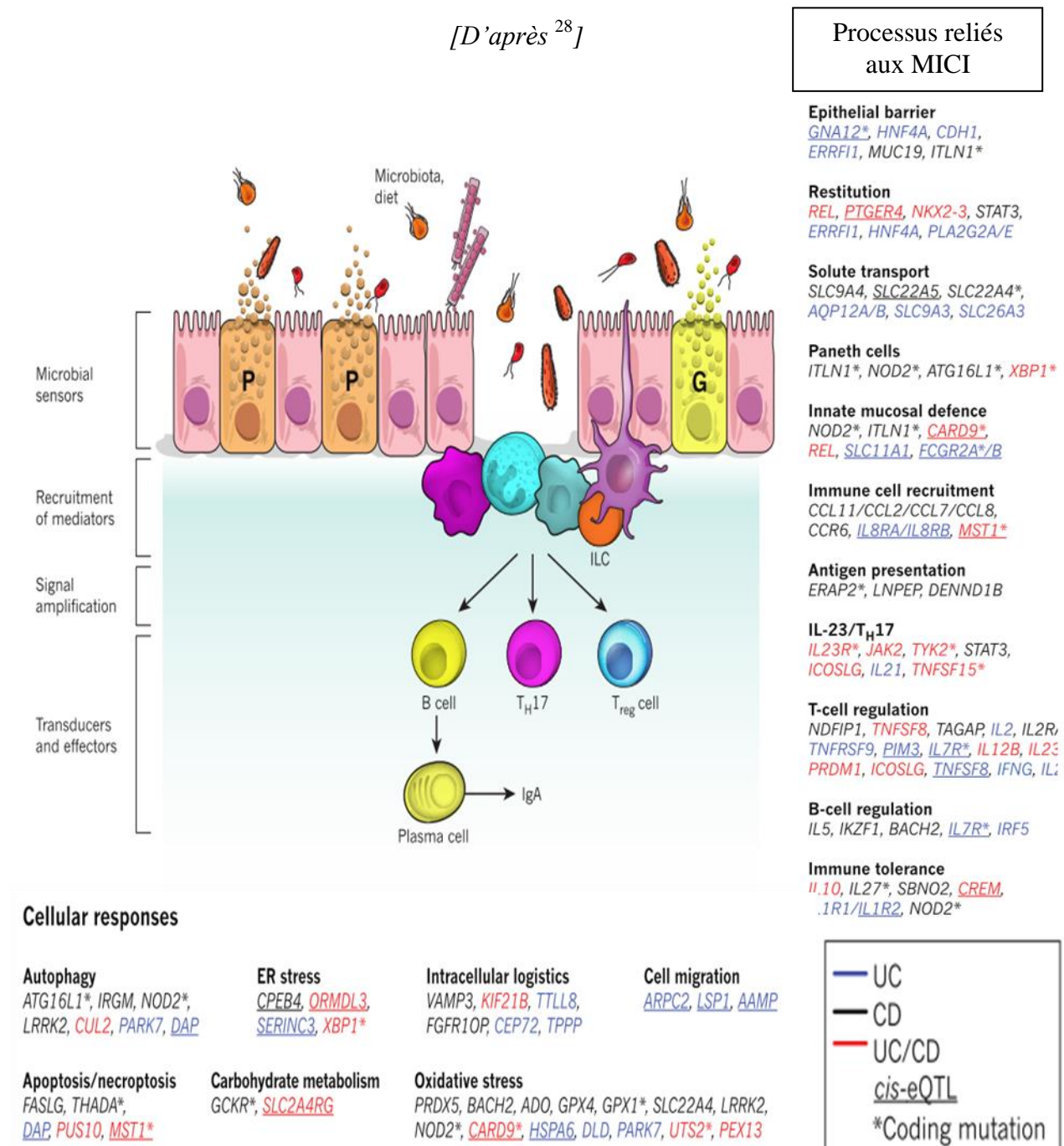
- Mais aussi des gènes codant pour des cytokines inflammatoires comme *IL27* et d'autres (**Figure 3**) qui font partie intégrante du système immunitaire [24; 16].

Plus de 99 SNPs de susceptibilités à la MC ou la RCHU ont été identifiés grâce aux GWA, dont une grande partie sont portés par des gènes acteurs de la réponse immunitaire [25].

Certains de ces SNPs sont spécifiques de la MC ou de la RCHU. Par exemple les gènes d'autophagie *ATG16L1* et *IRGM*, du récepteur *NOD2* et de l'intelectine *ITLNI* sont hautement spécifiques de la MC. En revanche, des loci liés à des voies de régulation de la réponse inflammatoire comme la cytokine *IL-10* [26; 27] et son récepteur *IL-10R* (qui a été

associé à des MICI infantiles) [26] ainsi que l'« Actin Related Protein 2/3 » (ARPC2) semblent spécifiques de la RCHU (Figure3).

**Figure 3 : Modèle de pathogenèse des MICI basé sur des GWA**



L'homéostasie intestinale est basée sur la coordination des cellules épithéliales (cellules de Paneth et cellules Gliales) ainsi que celles de l'immunité innée et adaptative (cellules lymphoïdes, lymphocytes B, lymphocytes TH17, lymphocytes T régulateur, plasmocytes). Une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale induit l'intrusion de microbes, cette



*intrusion est détectée par le système immunitaire inné qui va orchestrer une réponse inflammatoire appropriée d'une part en sécrétant des médiateurs extracellulaires qui recrutent d'autres cellules de l'immunité adaptative. Les variants génétiques, le microbiote intestinal et les facteurs immunitaires affectent l'équilibre de ces signaux. Les gènes impliqués dans ces processus et ayant des SNPs associés au MICI par GWA ont été classifiés selon leurs fonctions dans un contexte d'homéostasie intestinale et immunité. La couleur du texte indique si les gènes sont liés à des loci de risques associés à la MC (en noir), à la RCHU (en bleu) ou aux deux (en rouge). Les astérisques signifient une mutation de type codante*

## 1.2.2 FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Les MICI sont des pathologies complexes qui regroupent plusieurs facteurs environnementaux infectieux ou non infectieux. Les facteurs infectieux ou microbiens entraînent une réponse immunitaire inadéquate. L'argument le plus probant en faveur de l'implication de ces facteurs environnementaux est l'absence de concordance parfaite pour le même type de MICI entre deux jumeaux monozygotes [8].

### 1.2.2.1 FACTEURS NON INFECTIEUX

Les facteurs non infectieux regroupent:

- le mode de vie [29].
- le tabac (qui semble être en effet un facteur de risque pour la MC mais présente un effet protecteur de la RCHU) [30].
- L'alimentation [31].
- l'appendicectomie (négativement associée à la RCHU et dont l'association avec la MC est objet de discussion) [32].
- le psychique des patients [33].

Néanmoins, je vais me restreindre dans cette introduction à détailler les facteurs microbiens exogènes et endogènes qui participent à ces pathologies.

#### 1.2.2.2 FACTEURS INFECTIEUX

De nombreux arguments épidémiologiques, cliniques et expérimentaux plaident en faveur de l'intervention d'agents infectieux dans la pathogenèse des MICI. Tout d'abord, les tableaux cliniques et biologiques des MICI sont similaires à ceux des colites infectieuses. De plus, des études démontrent une amélioration de l'état général chez des patients MICI lorsqu'ils sont traité par des antibiotiques [34]. Enfin, les loci de susceptibilité génétique comme *NOD2*, *CARD9* (Chapitre 1.2.1) codent pour des récepteurs de l'immunité activés par des signaux pathogènes, les « Pathogen-Associated Molecular Patterns » PAMPs (**Figure4**).

Tous ces indices mettent en avant un rôle évident des microorganismes dans la pathogenèse des MICI. L'intestin abrite tout un microenvironnement qui regroupe une multitude de microorganismes (bactéries, levure, champignons,...) appelé microbiote (voir chapitre 1.2.2.2.2). La biomasse bactérienne qui le compose est majoritairement anaérobie et appartiennent à deux grands groupes les Bacteroides (Cytophaga, Flavobacterium et bacteroides) et les Firmicutes (Clostridium et Eubacterium). Une population aérobie y est aussi retrouvée, des entérobactéries et des lactobacilles mais à des concentrations 100 à 1000 fois moins importantes [35].

L'étude de la microflore intestinale des patients atteints de MC, par des techniques de culture ou par des analyses moléculaires, a permis de mettre en évidence une dysbiose généralisée ou localisée, correspondant à la diminution du nombre de bactéries habituelles, à l'augmentation du nombre de bactéries inhabituelles, qui s'accompagne quelquefois de la réduction de la biodiversité des espèces bactériennes.

#### Voies de signalisations activées par les facteurs infectieux

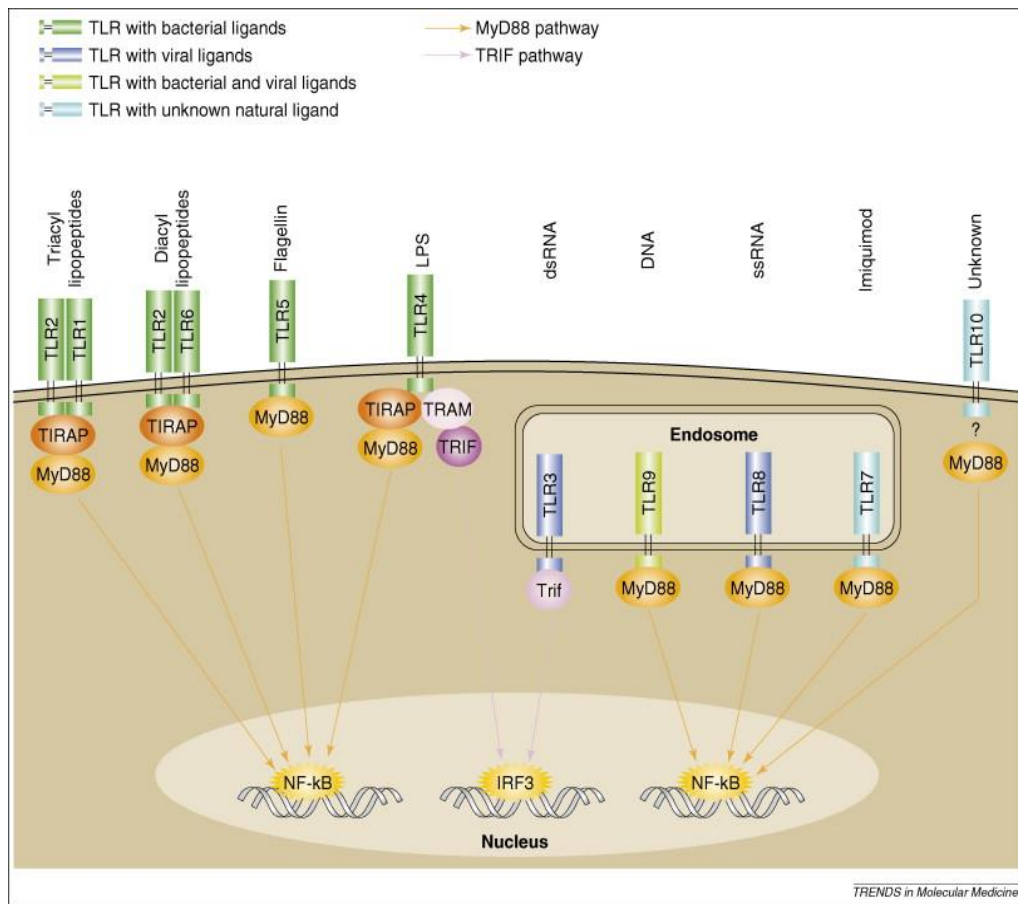
Les cellules intestinales (ainsi que les cellules endothéliales et certaines cellules myéloïdes) expriment un ensemble de « Pattern Recognition Receptors » (PRR) qui agissent comme des sentinelles et détectent les PAMPs lors d'une infection [<sup>36</sup>].

Parmi ces PRRs on trouve la famille des « Toll Like Receptor » (TLRs). Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires localisés au niveau de la membrane externe des cellules (TLR-1, -2, -6, -5, -4 et -10) ou au niveau de vésicules intracellulaires (TLR-3, -9, -8 et -7) [<sup>37</sup>] (**Figure 4**).

Les TLRs reconnaissent différents composants en fonction de l'agent infectieux. Tous ces TLRs, excepté TLR-3, activent les voies NFκB et « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAPK) via la protéine MyD88. TLR-4 qui reconnaît le lipopolysaccharide (LPS), un composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, a été largement étudié dans la littérature pour son rôle dans les MICI [<sup>38</sup>]. Il est surexprimé dans la MC et la RCHU [<sup>39;40</sup>]. Il est capable d'activer la voie NFκB de manière MyD88 dépendante mais aussi la voie de l'IRF3 « Interferon Regulatory Factor 3 » via TRIF (**Figure 4**), TLR-5 qui reconnaît la flagelline (**Figure4**) est exprimé par les cellules de l'immunité innée ainsi que les cellules épithéliales intestinales [<sup>36</sup>]. Les souris déficientes pour le gène *TLR5* développent une colite exacerbée [<sup>41</sup>]. De forte dose de l'Immunoglobuline spécifique de la flagelline ont été détectées chez des patients MC insinuant un rôle de ces récepteurs dans la réponse chronique inflammatoire [<sup>42</sup>].

**Figure 4 : Les différents TLRs, leurs ligands respectifs ainsi que les voies de signalisation activées.**

*[Adapté de <sup>37</sup>]*



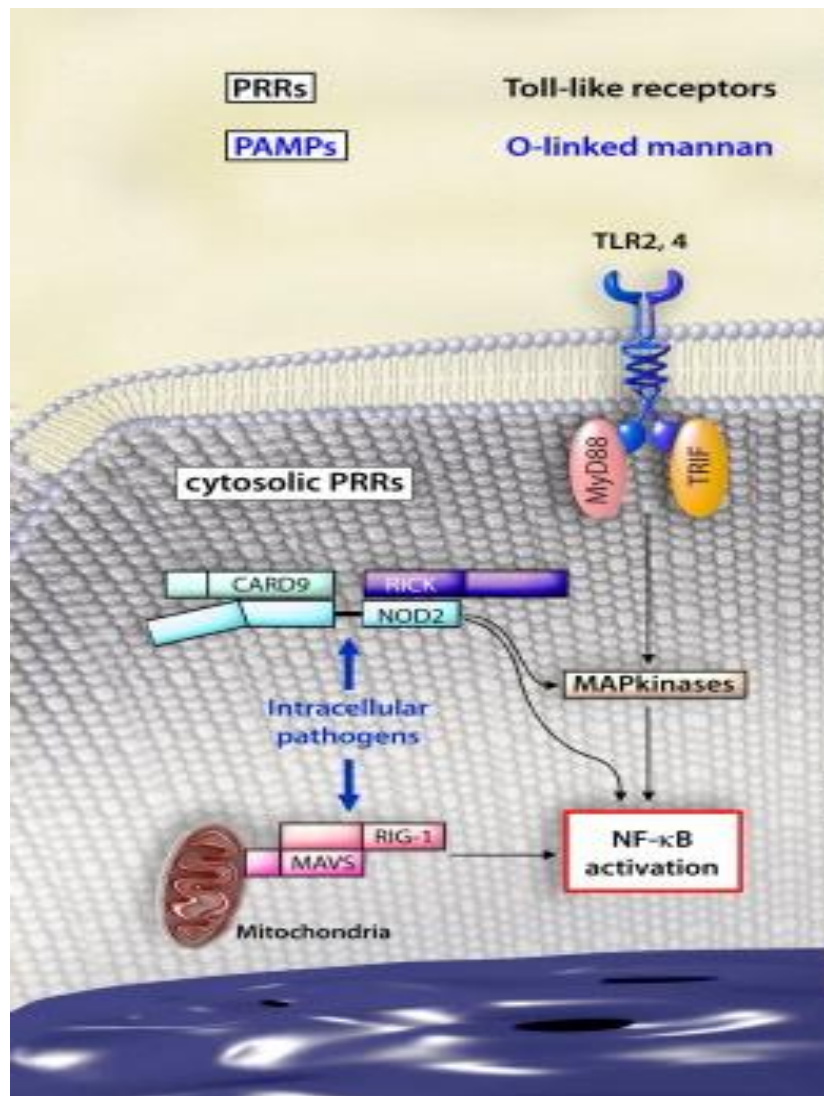
Les PRRs comprennent aussi des sentinelles cellulaires cytosoliques. La famille des NODs avec plus particulièrement NOD1 et NOD2 est clairement reliée aux MICI (chapitre 1.2.1) [<sup>43</sup>; <sup>44</sup>]. Par exemple, NOD2 reconnaît le Muramyl dipeptide (**MDP**), le motif peptidoglycan minimum commun à toutes les bactéries, et engage une interaction avec la protéine « Receptor Interacting Protein Kinase 2 » (RIPK2/RICK) qui induit en retour l'activation de la voie NFκB (**Figure 5**).

D'autres PRRs répondent aux différents PAMPs d'origine non bactériennes, comme la famille des « RIG Like Receptors » (RLRs) par exemple.

La protéine « Retinoid Inducible Gene 1 » RIG-1 est le représentant de cette famille le plus étudié (**Figure 5**). RIG-1 détecte des PAMPs viraux et il est aussi capable d'activer la voie NF- $\kappa$ B.

**Figure 5 : Rôle de CARD9 et NOD2 dans la réponse aux microbes**

[<sup>45</sup>]



*L'activation du TLR 4/2 par ces composés PAMP représenté par les « O-linked mannan » sur la figure résultent en une activation de NF- $\kappa$ B médiée par MyD88 et TRIF. Les pathogènes intracellulaires sont reconnus par des PRRs cytosoliques comme NOD2 et le gène induit par l'acide rétinoïque RIG-1. Ces récepteurs activent des voies de signalisation intracellulaire permettant la transcription de cytokines et autres effecteurs de la réponse immunitaire.*

### Facteurs bactériens

L'hypothèse selon laquelle les MICI résulteraient d'une réaction immunitaire exagérée à un agent infectieux exogène a laissé place ces dernières années à l'hypothèse de la perte de tolérance immunitaire envers des bactéries commensales endogènes. Cette dernière hypothèse est renforcée par les observations faites sur la composition de la flore entérique altérée chez des patients MICI. En effet, la flore intestinale d'un patient MICI présente un nombre plus élevé de bactéries dites agressives comme les Bacteroides, les Enterococci et certaines *E.coli* au détriment des souches dites protectrices qui sont les lactobacilles et les bifidobactéries. Ce phénomène de changement de la composition de la flore bactérienne chez des individus malades est appelé dysbiose [46].

La flore bactérienne intestinale, ou microbiote intestinal, représente une communauté de microorganismes qui co-évolue avec l'hôte et lui confère des effets bénéfiques incluant l'aide à métaboliser les nutriments, la modulation des réponses immunitaires et la défense contre les pathogènes [47].

Il ne faut pas oublier que l'iléon et le colon, les deux foyers inflammatoires de la MC et la RCHU, contiennent respectivement  $10^7$  à  $10^8$  et  $10^{11}$  à  $10^{12}$  microorganismes par gramme de contenu luminal [48], bactéries qui vivent en parfaite osmose avec leur hôte. Cependant, une dérégulation de l'équilibre homéostatique entre les bactéries commensales et la réponse immunitaire de l'hôte peut provoquer une inflammation. Comme souligné dans plusieurs très bonnes revues, de plus en plus de preuves suggèrent que la flore intestinale jouerait un rôle central dans le développement des MICI [46 ; 49].

Les expériences qui illustrent le mieux cette hypothèse sont celles réalisées sur des modèles d'animaux transgéniques porteurs de mutations sur des gènes ayant une fonction immunitaire (par exemple le récepteur des cellules T-alpha ( $TCR\alpha$ ) ou l'IL-10) [50 ; 51, 52]. En effet, ces souris qui développent spontanément des MICI lorsqu'elles sont élevées en conditions

normales (animalerie conventionnelle ou « EOPS ») [<sup>53</sup>], ne développent aucune inflammation si elles sont élevées en condition axénique (milieu dénué de tout germe) [<sup>54</sup>; <sup>55</sup>].

De plus un traitement antibiotique (Metronidazole, ciprofloxacine, vancomycine) de ces souris génétiquement altérée (IL-10<sup>-/-</sup>) démontrent un effet bénéfique de ces derniers par atténuation de la maladie [<sup>56</sup>]. Enfin, il ne faut pas oublier que le premier gène de susceptibilité associé au MICI est le gène NOD2 qui code pour un récepteur de reconnaissance de bactéries.

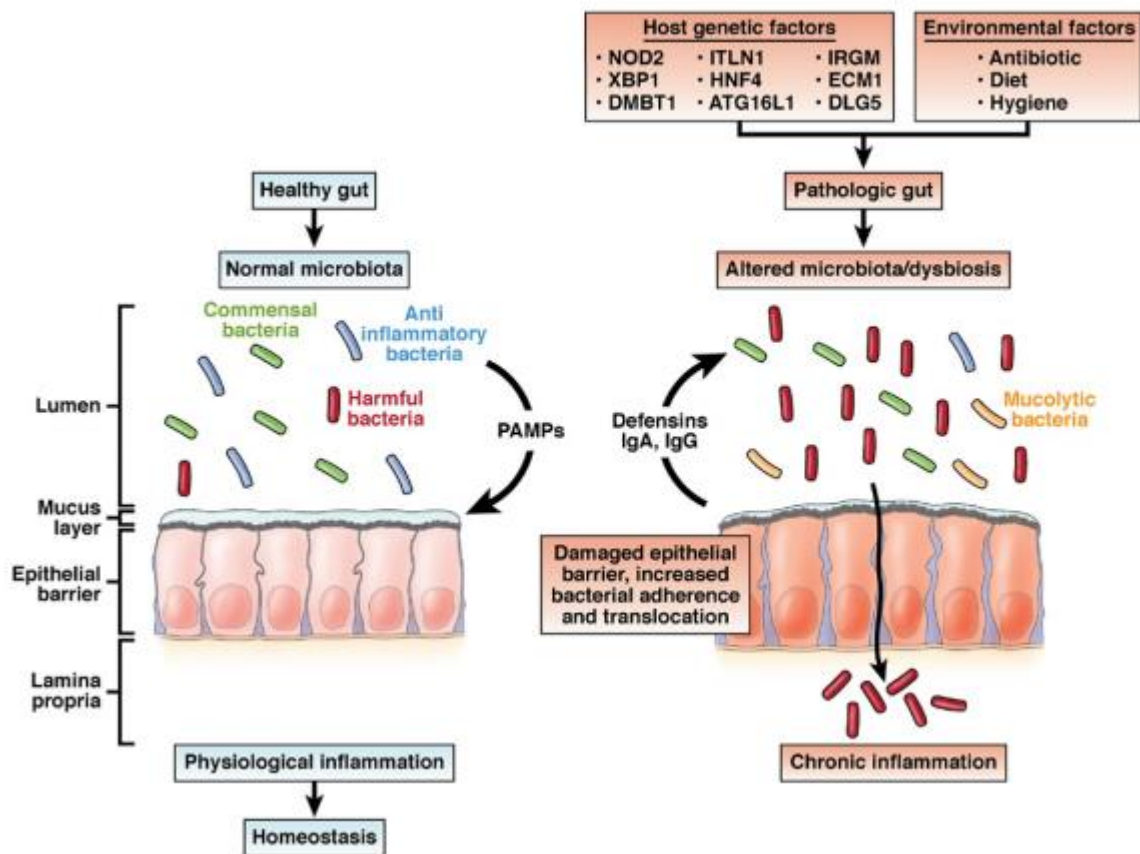
Au-delà du microbiote intestinal (**Figure 6**), plusieurs bactéries exogènes ont été associées à la pathogénèse des MICI. Parmi ces dernières on retrouve :

Des bactéries de la souche *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Ces dernières ont été isolées plus fréquemment de muqueuses intestinales de patients atteints de MC ou de RCHU que de celles de sujets contrôles [<sup>57</sup>]. Néanmoins, les études réalisées avec des antibiotiques qui ciblent ces bactéries n'ont pas donné de résultats concluants quant à leur rôle potentiel dans la mise en place des MICI [<sup>58</sup>; <sup>59</sup>]. *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis* ont aussi été retrouvées dans les lésions des patients MC [<sup>60</sup>; <sup>61</sup>]. L'équipe de JP Hugot a émis l'hypothèse que ces bactéries contribuent à la mise en place de la MC, ce qui reste à prouver [<sup>62</sup>]. La *Listeria monocytogenes* est l'agent bactérien le plus récemment mis en évidence dans les tissus de 75% des sujets atteints de MC ou de RCH. De ce fait un lien dans l'initiation et ou l'exacerbation des MICI a été suggéré pour cette bactérie mais aucune étude ne l'a confirmé par la suite [<sup>63</sup>].

C'est aussi le cas pour d'autres bactéries exogènes telles que *Chlamydia pneumoniae*, *Blastocystis hominis* et *Clostridium difficile* [<sup>64</sup>; <sup>65</sup>; <sup>34</sup>]. *Shigella flexneri*, [<sup>66</sup>] *Helicobacter pylori* [<sup>67</sup>], et certaines souches d'*Escherichia coli* ayant des propriétés invasives. [<sup>68</sup>; <sup>69</sup>; <sup>70</sup>].

**Figure 6 : Implication du microbiote dans les MICI**

[Adapté de <sup>71</sup>]



Le microbiote, le patrimoine génétique et des facteurs environnementaux contribuent à la mise en place d'une MICI. Chez un individu contrôle (à gauche), la barrière intestinale est intègre et la couche de mucus est épaisse, les bactéries anti-inflammatoires et commensales (présentes en densité plus élevée que les bactéries pathogènes) interagissent avec la muqueuse pour maintenir l'homéostasie. Cette interaction implique la reconnaissance de PAMPs par la muqueuse induisant une réponse inflammatoire physiologique de tolérance qui inhibe l'effet pro inflammatoire des bactéries pathogènes. Ces dernières restent confinées dans le lumen et ne traversent pas la couche épithéliale. Chez un patient MICI (à droite), la barrière intestinale est lésée et la couche de mucus protectrice est fine, une interaction anormale des microbes avec la muqueuse intestinale perturbe l'homéostasie. Il en résulte une inflammation chronique qui affecte la réponse immunitaire innée et adaptative ainsi que la composition qualitative et quantitative du microbiote.



### Facteurs viraux

La piste virale a été suspectée dans la mise en place des MICI. Plus particulièrement, l'observation d'une recrudescence de la MC chez des personnes ayant contractées le virus de la rougeole a permis de proposer que ce virus pouvait être un facteur déclenchant. Néanmoins, à ce jour aucune autre étude n'a corroboré cette hypothèse [72].

De même, le virus des oreillons, l'Epstein Barr virus et le cytomégalo virus ont aussi été suspectés mais aucun lien concret direct n'a été apporté [73; 74].

### Les autres microorganismes

Des levures ont aussi été considérées comme un des facteurs responsables de la réponse immunitaire aberrante des MICI. Parmi ces dernières on retrouve :

-*Saccharomyces cerevisiae*, qui est utilisée dans la levure pâtissière serait un facteur exacerbant la réponse immunitaire chez ces patients [75].

-*Candida albicans* qui colonise le tractus gastro-intestinal des souris et induit une sensibilisation contre les antigènes alimentaires pourrait être à l'origine de cette réponse immunitaire aberrante de la MC [76].

Enfin, Dans la catégorie des facteurs infectieux exogènes suspectés de jouer un rôle dans les MICI, certains ont été considéré comme conférant une protection contre l'apparition de la maladie. C'est le cas du parasite nématode [77] ou la bactérie *Helicobacter pylori* [78].

De manière générale, ces nombreuses études épidémiologiques ont montré que des infections intestinales, bactériennes comme virales, pouvaient précéder la révélation d'une MICI ou initier les rechutes. Il s'agirait, dans ces cas, d'agents infectieux non spécifiques initiant l'inflammation intestinale. Celle-ci serait entretenue ensuite par des défauts dans les fonctions de barrière intestinale de l'hôte, une réponse immunitaire exacerbée et la constitution d'un

microenvironnement favorable à la chronicité inflammatoire par abondance de facteurs pro-inflammatoires dans une muqueuse fragilisée [79].

### 1.3 INFLAMMATION

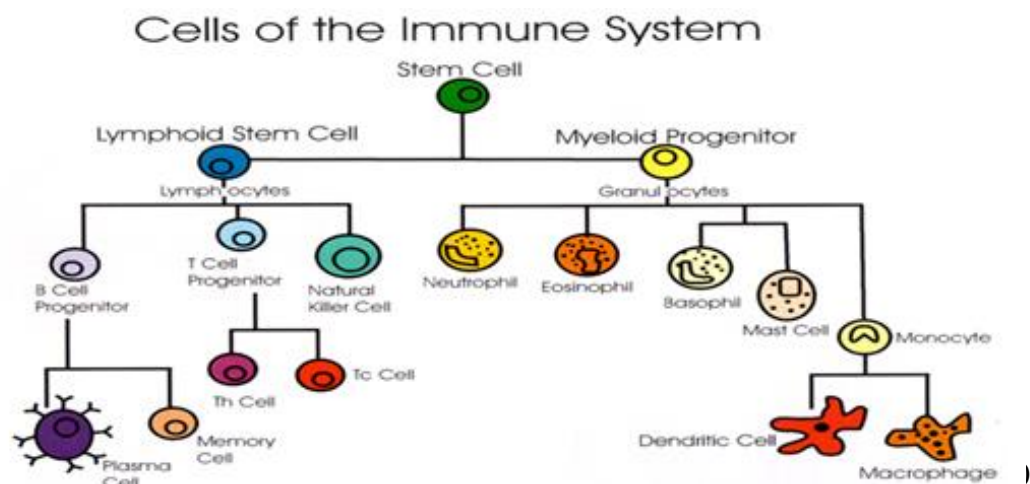
Il y a plus de 2000 ans Aulus Cornelius Celsus a décrit l'inflammation par ses quatre signes cliniques, rougeur, œdème, chaleur et douleur [Celsus AC De medecina, selfpublished ; A.D.25]. Au niveau organique, l'inflammation est une réaction protectrice qui se traduit par une réponse des tissus vivants vascularisés à l'agression d'un agent exogène ou endogène. L'inflammation peut être physiologique ou pathophysiologique. Dans cette partie je vais me limiter à l'inflammation dans un contexte intestinal.

#### 1.3.1 INFLAMMATION PHYSIOLOGIQUE

L'inflammation physiologique est un processus habituellement bénéfique, qui vise à éliminer l'agresseur et à réparer les lésions tissulaires. Elle initie les réponses immunitaires innée et adaptative. Chacune de ces réponses fait intervenir un ensemble de cellules immunitaires spécifiques ayant subi une différenciation et une maturation finement régulée que je ne détaillerai pas ici (**Figure 7**).

**Figure 7 : Les cellules immunitaires et leurs précurseurs**

*[Web Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology]*

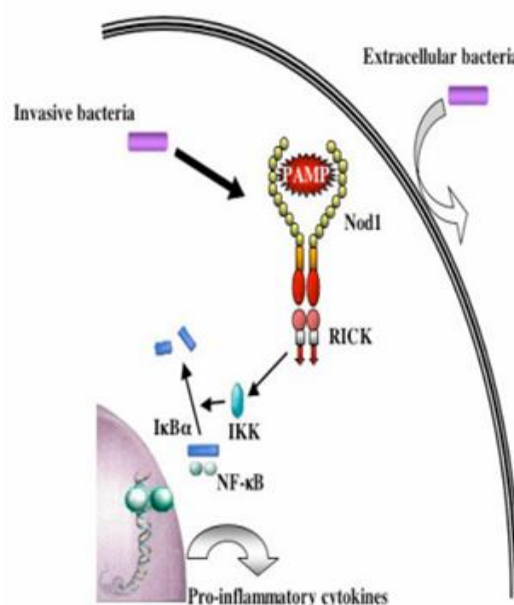
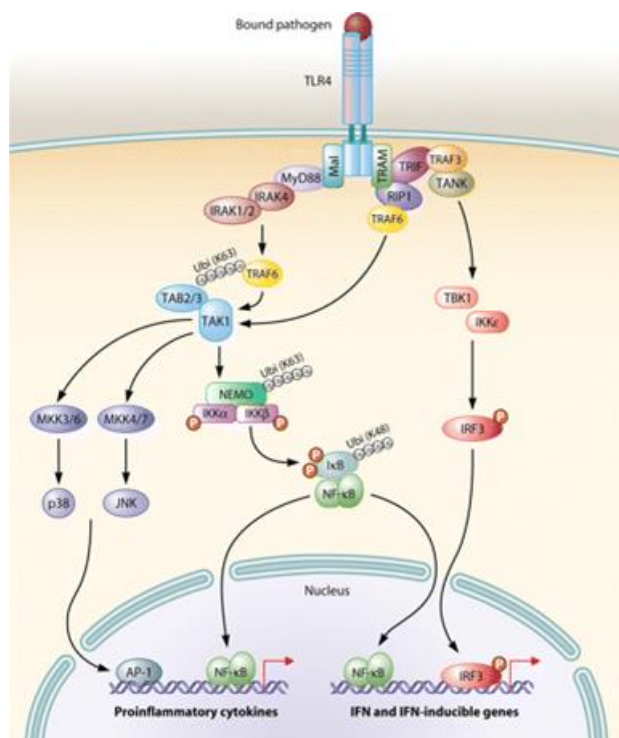


#### 1.3.1.1 RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE :

Les cellules de l'immunité innée sont les macrophages, les mastocytes, les « Natural Killer »(NK), cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles (**Figure7**). Ces cellules expriment des récepteurs TLRs, leur permettant de reconnaître des motifs PAMPs et des « Danger-associated molecular patterns » (DAMPs). La reconnaissance des PAMPs par les TLRs (**Figure 8**) induit des cascades intracellulaires faisant intervenir des voies dépendantes de l'adaptateur «Myeloid Differentiation primary response gene 88 » (MyD88) ainsi que d'autres voies indépendante de MyD88. Ces dernières impliquent « IL-1 Associated Kinase » (IRAK) et le « TNF-receptor associated factor 6 » (TRAF6) [<sup>80</sup>]. Les cellules de l'immunité sont aussi armées pour la reconnaissance des PAMPs intracellulaires. Cette défense passe par la reconnaissance de peptidoglycans bactériens par les NLRs (NOD1 et NOD2) conduisant à l'activation de la voie NFκB grâce à l'activation des adaptateurs TRAF2 et TRAF5 en aval de NOD1 et RIPK2 en aval de NOD2 [<sup>81</sup>]. L'activation de ces voies de signalisation est essentielle pour la synthèse et la sécrétion des médiateurs de la réponse immunitaires que sont les cytokines et les chimiokines. Les cytokines sont des protéines ou des peptides constituant un large groupe de molécules qui regroupe les interférons (IFNs), les interleukines (ILs), plusieurs « colony-stimulating factors » (CSFs), les « tumor necrosis factors » (TNFs), et les « transforming growth factors » (TGFs).

**Figure 8 : voies MyD88 dépendante et indépendante TLRs et NLRs**

[<sup>80</sup>].



*La liaison spécifique antigène bactérien et récepteur se fait à un niveau extracellulaire via les TLRs membranaires, ou à l'intérieur même de la cellule par les NODs. Ces interactions induisent une cascade de signalisation protéique nécessaire à la mise en place d'une réponse inflammatoire appropriée par l'hôte*

### 1.3.1.2 RÉPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE :

Dans un deuxième temps, si l'agression persiste, une réponse immunitaire dite « adaptative » prend le relais faisant intervenir les lymphocytes B et T eux même activés par les cellules dendritiques. Cette réponse est hautement spécifique et résulte d'un développement et d'une maturation complexe des cellules immunitaires. Les cellules clés de la réponse immunitaire adaptative sont les lymphocytes T. Les cellules T naïfs ou non activés sont appelés Th0. Les Th0 sont activées via les cytokines et se différencient en Th1, Th2 ou Th17 en fonction des

cytokines sécrétées. Les Th1 sont nécessaires à l'élimination des pathogènes intracellulaires, les Th2 ont un effet protecteur antiparasites et transmettent les réactions allergiques enfin Th17 peut contribuer à la clearance des bactéries extracellulaires et des champignons. [82]. Cependant, une réponse mal régulée des cellules T avec une différenciation ou une activation anormale peut conduire à la mise en place d'une inflammation délétère par relargage excessif de cytokines et chemokines qui aura un effet pathogénique sur les composants des deux types d'immunité innée et adaptative (**Figure 6**).

### 1.3.2 INFLAMMATION PATHOPHYSIOLOGIQUE :

Lorsque l'inflammation persiste elle devient délétère pour l'organisme. Comme nous l'avons vu précédemment, les MICI sont des pathologies qui comportent des phases d'inflammation chronique résultant d'une activation récurrente et inappropriée du système immunitaire au niveau de la muqueuse de l'intestin en réponse à la flore intestinale, réponse facilitée par la présence de facteurs génétiques et environnementaux.

Cette réponse aberrante est aussi très probablement associée à des défauts dans les fonctions de barrière de l'épithélium intestinal ainsi que le système immunitaire (**Figure 6**) [83]. La muqueuse intestinale est constamment exposée aux différents composants du lumen (microbes, aliments, etc) sources de matériel antigénique. De ce fait, l'intestin est constamment soumis à une inflammation faible. Il a été montré que ce faible niveau d'inflammation permet la mise en place d'un phénomène de tolérance intestinale indispensable à l'éducation du système immunitaire [84; 85; 86].

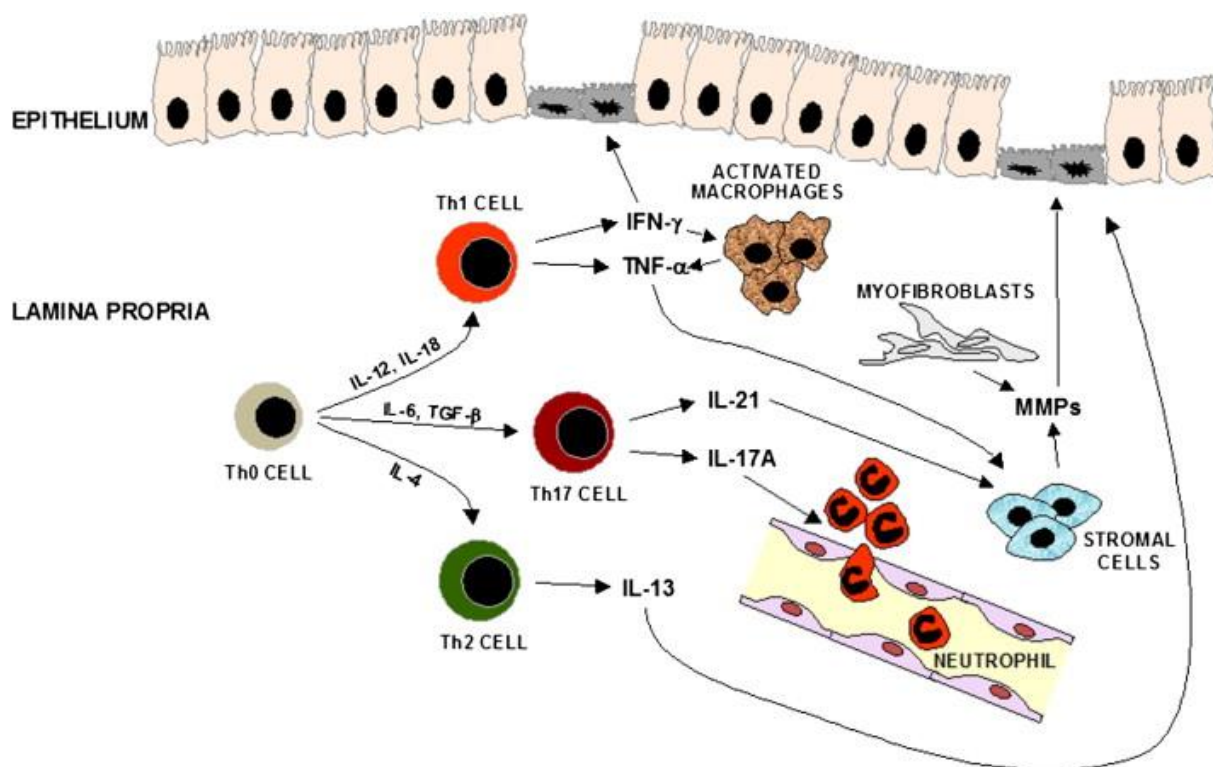
Des études réalisées sur des modèles murins de colite induite (DSS, TNBS) ont permis de mettre en évidence le rôle de la signalisation via les TLRs dans la régulation des fonctions de

la barrière épithéliale. Par exemple, les souris n'exprimant pas TLR-2, -4, -5 ou -9 ou qui sont déficientes pour la protéine MyD88 montrent (1) une susceptibilité élevée au développement de colite aiguë induite par le dextran sulfate (DSS), (2) un défaut de réparation des tissus et (3) une mortalité plus forte [87; 38].

De plus, un polymorphisme dans le gène *TLR2* a été associé à des patients MICI [88].

**Figure 9 : Déséquilibre de l'homéostasie intestinale**

[D'après<sup>89</sup>]



Le schéma représente les différents sous-types de cellules T et les effets majeurs des cytokines pro-inflammatoires sécrétées par ces cellules T qui sont impliquées dans le développement des lésions observées dans les MICI. Au cours de l'inflammation, les cellules Th0 se différencient en T helper Th1, Th17 et/ou Th2 sous l'action d'interleukines IL-12 et IL-18, IL-6 et TGFβ ou IL-4 respectivement. A leur tour, les Th1 induisent la production de plus de TNFα par les macrophages activés et entraînent ainsi l'apoptose (mort cellulaire) des cellules épithéliales intestinales. Le TNFα induit la différenciation des cellules stromales de la lamina propria en myofibroblasts qui commencent à sécréter des grandes quantités de

*metalloproteinases MMPs qui dégradent les tissus. Les Th2 dont le rôle dans la médiation des lésions RCHU reste source de débats, représentent la source majeure d'IL-13 qui augmente la perméabilité intestinale et induit la différenciation des entérocytes et leur apoptose. Les Th17 relarguent de l'IL-17A qui joue un rôle central dans le recrutement des neutrophiles au site actif de l'inflammation et de l'IL-21 qui, parmi d'autres actions pro-inflammatoires, induit la production de MMP par les cellules du stroma. Les MMPs dégradent la matrice extracellulaire et la membrane basale.*

L'intestin est un organe qui repose sur un équilibre complexe. Il constitue une interface d'interaction entre un milieu (lumière intestinale) à apports exogènes (microorganismes et aliments) et les cellules de l'hôte. C'est une barrière dynamique d'échanges constants basés sur des signaux extracellulaires (PAMPs, DAMPs par exemple) et intracellulaires (cytokines inflammatoires, facteurs de transcriptions et autres) permettant le maintien de cet équilibre. Toute altération qui affecte un de ses constituants induit une rupture de ce dernier (l'équilibre) qui se traduit par une pathologie.

Les MICI sont un exemple illustratif de ces pathologies. Le phénomène de dysbiose représente une rupture d'équilibre de la flore bactérienne, la réponse inflammatoire chronique est le fruit d'un déséquilibre dans un mécanisme de l'hôte et tout ceci est accompagné d'une « cassure » (perte d'intégrité) de la muqueuse intestinale.

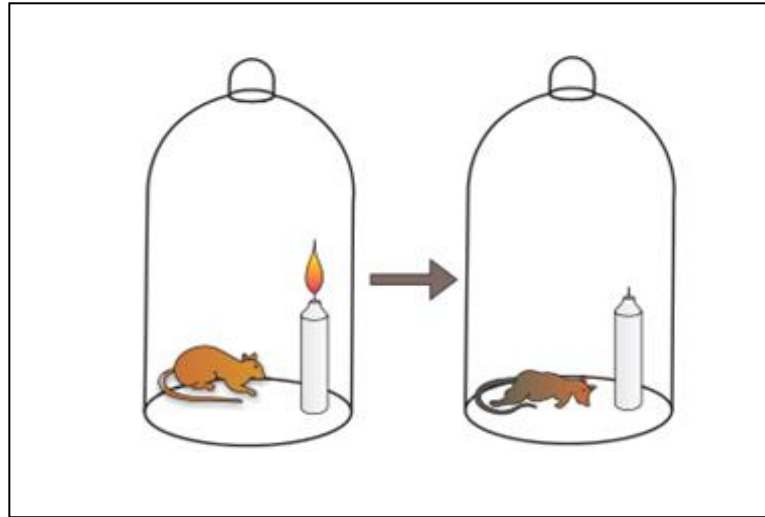
## **2 Hypoxia Inducible Factor 1 alpha (HIF-1alpha):**

### **2.1 GÉNÉRALITÉS:**

La caractérisation de l'oxygène (O<sub>2</sub>) comme gaz a été faite dès 1774 par Joseph Priestley. L'expérience qui consistait à mettre une souris en présence d'une bougie allumée sous cloche a permis de démontrer l'importance vitale de ce gaz. En effet, le rongeur a montré des signes délétères une fois que la bougie a consommé l'O<sub>2</sub> présent sous la cloche (**Figure 10**) [<sup>90</sup>].

**Figure 10 : L'expérience de Priestley**

*[Adapté<sup>90</sup>].*



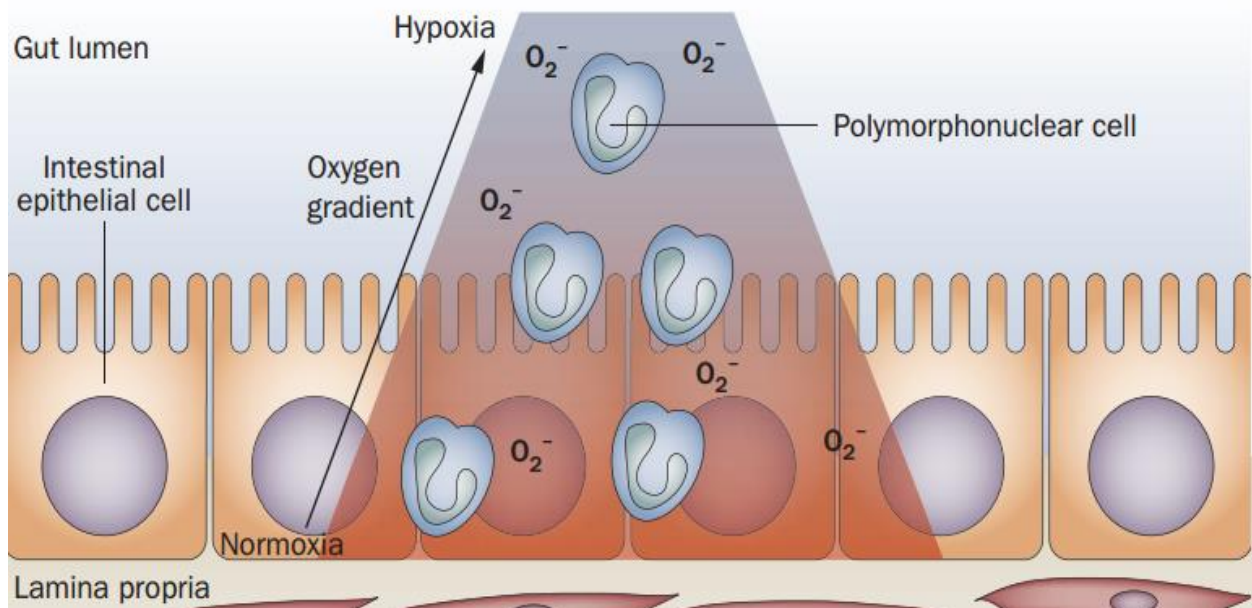
L'oxygène (O<sub>2</sub>) représente environ 21% de la composition d'une pièce en gaz. A l'échelle cellulaire, la teneur en O<sub>2</sub> est de 2 à 9% [<sup>90</sup>]; elle peut passer à moins de 2% en hypoxie. Afin de s'adapter à cette baisse d'O<sub>2</sub>, une cellule subit un changement du profil transcriptionnel de certains de ses gènes [<sup>91</sup>]. L'acteur principal de ce changement est le facteur « Hypoxia Inducible factor » ou HIF.

Compte tenu de la nature anatomique de l'intestin cet organe présente un profil d'oxygénation particulier caractérisé par la présence de zones à très faible taux d'O<sub>2</sub>. Des études comparatives des réponses fonctionnelles entre des cellules épithéliales provenant de différents tissus ont démontré que les cellules épithéliales intestinales présentent une résistance unique à l'hypoxie [<sup>92</sup>]. De plus, il existe une hypoxie liée à l'inflammation qui se met en place au niveau des muqueuses lésées de patients MICI (**Figure 11**).



**Figure 11 : Gradient d'oxygénation de la muqueuse intestinale.**

*[Adapté de <sup>93</sup>]*



*Au cours de l'inflammation de la muqueuse intestinale, plusieurs facteurs influencent l'apport et les besoins en oxygène des tissus. L'afflux de neutrophiles vers le site d'inflammation ci-dessus est un phénomène consommateur d'O<sub>2</sub> qui induit une hypoxie localisée.*

### 2.1.1 FACTEUR DE TRANSCRIPTION

HIF-1 a été découvert grâce à l'identification de l'« Hypoxia Response Element » (HRE, 5'-RCGTG-3') dans la région 3' activatrice du gène humain de l'érythropoétine (EPO), une hormone qui stimule la prolifération des érythrocytes et qui régule la distribution d'O<sub>2</sub> dans les tissus [<sup>94</sup>, <sup>95</sup>].

Ce facteur de transcription qui lie des HRE est formé de deux sous unités, HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ /ARNT et appartient à la famille des helix loop helix (bHLH-PAS). Les domaines PAS peuvent médier les réponses induites par des stimuli environnementaux via une liaison directe

avec un ligand ou en interagissant avec d'autres cofacteurs comme les « heat shock protein » 90 (HSP90) [<sup>96</sup>].

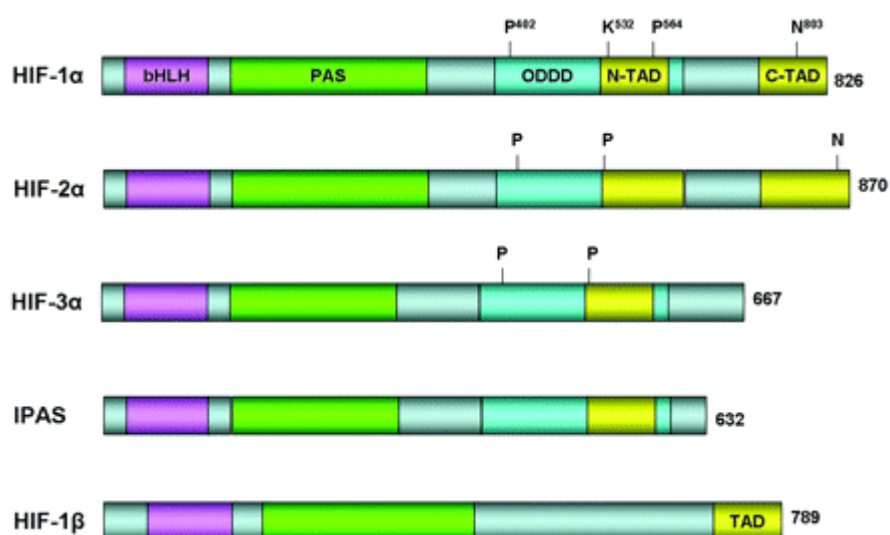
HIF contient deux domaines de transactivation ou TADs reliés entre eux par un domaine inhibiteur. La sous unité  $\alpha$  est codé par trois gènes HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  et HIF-3 $\alpha$  chez les mammifères. Ces trois gènes présentent des homologies structurales (**Figure 12**). HIF contient aussi un domaine de régulation en réponse à l'O<sub>2</sub> appelé « oxygen dependent domain » (ODD).

HIF-1 $\alpha$  est exprimé de façon ubiquiste alors que HIF-2 $\alpha$  (aussi appelé EPAS pour « endothelial PAS protein », HLF pour « HIF-1 $\alpha$  Like Factor », et HRF pour « HIF Related Factor ») et HIF-3 $\alpha$  sont restreintes à certains tissus [<sup>97</sup>].

Il existe deux homologues de la sous unité beta, HIF-2 $\beta$ /ARNT2 et HIF-3 $\beta$ /ARNT3 (aussi connue comme bMAL). HIF-2 et HIF-3 ont été décrites pour participer respectivement au développement de l'hypothalamus et à la régulation de l'horloge circadienne, deux évènements indépendants de la concentration en O<sub>2</sub> [<sup>98</sup>; <sup>99</sup>; <sup>100</sup>].

**Figure 12 : Structure des sous unités HIF humains.**

[<sup>101</sup>]



*HIF-1 $\alpha$*  (*HIF-1 $\alpha$* , *HIF-2 $\alpha$* , *HIF-3 $\alpha$*  e *IPAS*) et *HIF-1 $\beta$*  sont des membres de la famille des protéines *bHLH* et *PAS*. *HIF- $\alpha$*  contient un domaine *ODD* qui permet la régulation en réponse à l'oxygène par l'hydroxylation de deux résidus prolines (*P*) et l'acétylation de la lysine (*K*). Les résidus prolines sont conservés sur *HIF-2 $\alpha$*  et *HIF-3 $\alpha$* . *HIF-1 $\alpha$*  et *HIF-2 $\alpha$*  contiennent aussi deux domaines de transactivation (*C-TAD* et *N-TAD*) alors que *HIF-1 $\beta$*  ne contient qu'un seul *TAD*. Le nombre d'acides aminés total pour chaque structure est noté sur la droite du schéma.

### 2.1.2 **RÉGULATION:**

En réponse à une diminution dans la concentration d'O<sub>2</sub>, HIF régule l'expression de gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'angiogenèse, le transport oxydatif, le métabolisme ferreux, la glycolyse, la glycogénèse, l'induction de facteur de croissance, l'apoptose, les processus d'invasion et de métastase cellulaire ainsi que dans l'autophagie

En retour, ce facteur est lui-même finement régulé ; les régulations qui interviennent sur la sous unité *HIF-1 $\alpha$*  se font à un niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel, en fonction du stimulus appliqué.

Parmi les nombreux stimuli de *HIF-1*, je me concentrerai dans cette introduction sur ceux liés à l'inflammation et à l'infection à savoir, l'hypoxie, les ROS, les NO, les cytokines, le LPS et certaines bactéries.

#### 2.1.2.1 **RÉGULATION PAR L'HYPOXIE :**

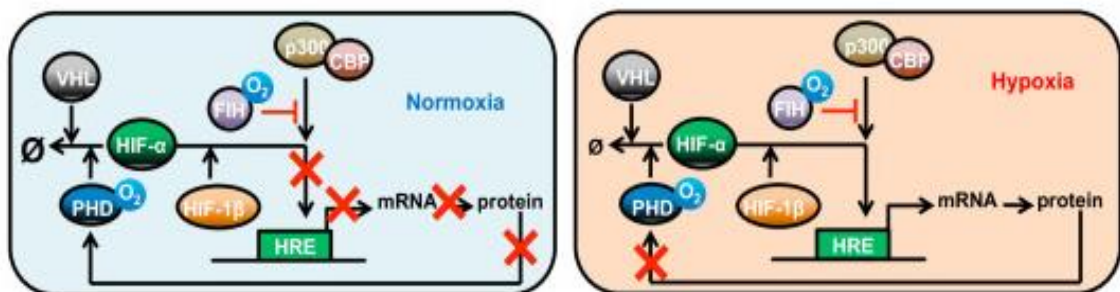
L'ARNm des sous unités *HIF-1 $\alpha$*  et *HIF-1 $\beta$*  est exprimé de manière constitutive et ubiquitaire. En présence d'O<sub>2</sub> *HIF-1 $\alpha$*  est dégradé par la machinerie du protéasome. Lorsque la

concentration en O<sub>2</sub> intracellulaire devient inférieure à 2%, HIF-1 $\alpha$  est stabilisée car sa dégradation par le protéasome est inhibée [<sup>102</sup>].

En effet, en normoxie, HIF-1 $\alpha$  est une protéine très instable dont la durée de vie est inférieure à 5 minutes. D'une manière générale, cette stabilité est régulée prioritairement par la famille des prolyl hydroxylases PHD1, PHD2 et PHD3 (aussi désignée par HPH ou EGLN). Les PHDs catalysent l'hydroxylation Fe(II) dépendante des résidus prolyl spécifiques (Pro-564 et Pro-402) présents sur le domaine de dégradation (ODD) [<sup>103</sup>]. Cette hydroxylation permet la fixation de la protéine von-Hippel-Lindau (pVHL) une composante du complexe de ligase E3 qui cible HIF-1 $\alpha$  vers la dégradation par le protéasome. En condition hypoxique, l'activité des PHDs diminuent, les sous unités  $\alpha$  sont stabilisées, elles sont capables de transloquer dans le noyau pour se fixer aux sous unités  $\beta$  [<sup>104</sup>] et former un facteur de transcription actif.

Il est à noter que d'autres protéines participent à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en conditions hypoxique. En effet, les « Histones Desacétylases » HDAC-4 et -6 s'associent avec HIF-1 $\alpha$  induisant sa déacétylation ; HIF-1 $\alpha$  déacétylée est non dégradable par le protéasome [<sup>105</sup>].

**Figure 13 : Eléments clé de la régulation de HIF en normoxie et en hypoxie**



En présence d'oxygène, les PHD hydroxylent 2 résidus proline dans le domaine ODD (Oxygen-Dependent Degradation) des sous-unités HIF $\alpha$ . pVHL se lie à HIF $\alpha$  hydroxylé, l'ubiquitinyne et entraîne sa dégradation par le protéasome 26S. Au contraire, en hypoxie, aucun de ces résidus n'est hydroxylé, les sous-unités HIF $\alpha$  sont stabilisées, elles migrent dans le noyau où elles interagissent avec HIF $\beta$  pour former un facteur de transcription actif et contrôler l'expression des gènes cibles de HIF.

En hypoxie, HIF-1 $\alpha$  est aussi régulée positivement au niveau de son activité transcriptionnelle par les co-activateurs transcriptionnels p300 et CBP [<sup>106</sup>], et négativement par le « Factor Inhibiting HIF » FIH (Figure 13) qui hydroxyle un résidu asparagine du C-TAD de HIF-1 $\alpha$ , empêchant ainsi le recrutement des co-activateurs p300 et CBP [<sup>107</sup>; <sup>107</sup>].

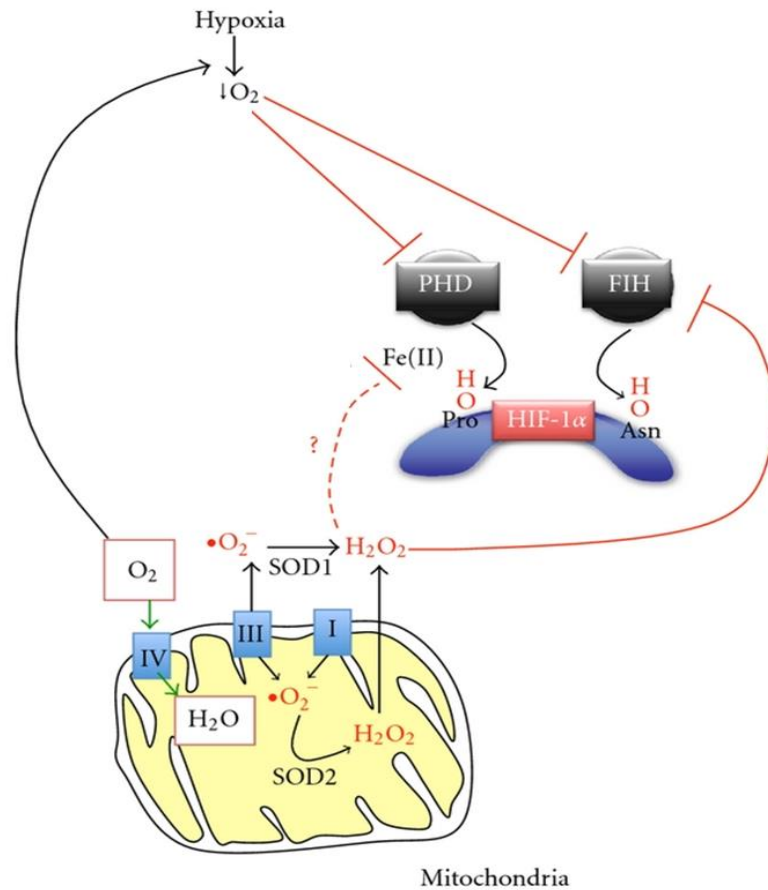
Au-delà de l'hypoxie, il existe des molécules qui, en condition normoxique, régule la stabilité, le niveau d'expression et l'activité de HIF-1. Parmi ces molécules on compte, Hsp90 [<sup>108</sup>] ainsi que des facteurs de croissance dont l'« Epidermal Growth Factor »( EGF) et l'insuline [<sup>109</sup>].

#### 2.1.2.2 REGULATION PAR LES ROS :

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites par différents acteurs cellulaires comme la NADPH oxydase et le complexe respiratoire III des mitochondries. Ces ROS pouvant être délétères pour les cellules lorsqu'ils sont produits en grande quantité, il existe des mécanismes qui les contrôlent finement en les transformant en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'hyperoxyde dismutase (SOD1 et SOD2) est un de ces mécanismes [<sup>110</sup>]. La génération des ROS se fait aussi par des inducteurs non hypoxique de HIF-1 $\alpha$  comme des hormones, des peptides vasoactifs et des facteurs de croissance. Par exemple, l'angiotensine II permet d'augmenter HIF-1 $\alpha$  en activant la voie PI3K via les ROS [<sup>111</sup>]. D'autre part, l'augmentation d'expression de HIF-1 $\alpha$  dans une lignée de cancer de la prostate (PC-3) en réponse à un traitement à l'insuline est liée à l'accumulation des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [<sup>112</sup>]. Enfin, une hypothèse très récente stipule que les ROS auraient un effet inhibiteur sur les PHDs. Pratiquement, les ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par exemple) inhiberaient les PHDs directement en oxydant leur site de fixation du fer, induisant ainsi une stabilisation indirecte de HIF-1 $\alpha$ . En revanche, il a été montré dans cette même étude que le facteur « Factor Inhibiting HIF » (FIH) présente une bonne affinité pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De ce fait H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait inhiber FIH ce qui en retour induirait HIF-1 $\alpha$  [<sup>113</sup>].

**Figure 14 : Régulation de HIF par les ROS**

[Adapté de <sup>114</sup>]



Les variations intracellulaires en  $O_2$  sont détectées par les PHDs et les FIHs. Deux inhibiteurs majeurs de HIF-1α. Lorsque la  $[O_2]$  est faible, les PHDs et FIHs sont inhibées et la réponse hypoxique est activée. La chaîne de transport d'électron mitochondriale produit le superoxide qui est converti en  $H_2O_2$  par les Superoxide Dismutase SOD1 et SOD2. En hypoxie, la production des ROS dérivée du complexe III augmente et contribue à la stabilisation de HIF-1α en inhibant les FIHs et les PHDs même si l'affinité de ces dernières pour les ROS est faible.

### 2.1.2.3 REGULATION POST TRADUCTIONNELLES DÉPENDANTE DE L'O<sub>2</sub>

Il existe aussi des régulations post traductionnelles de HIF-1  $\alpha$  dépendante du taux d'O<sub>2</sub> :

-Par dé ubiquitination : L'enzyme USP20, aussi appelée VDU2 (pVHL-interacting de ubiquitylating enzyme 2), est la seule enzyme dé-ubiquitinant (DUB; de-ubiquitylating enzyme) HIF-1 $\alpha$  connue à ce jour [<sup>115</sup>].

-Par sumoylation : La sumoylation est une modification post-traductionnelle réversible, proche de l'ubiquitination, qui consiste en l'attachement de la protéine SUMO (small ubiquitin-like modifier) à ses protéines cibles [<sup>116</sup>]. La sumoylation de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie permet soit sa stabilisation [<sup>117</sup>], soit sa dégradation via pVHL [<sup>118</sup>].

-Par S-nitrosylation : La S-nitrosylation consiste au couplage d'un groupe thiol d'une cystéine réactive à une molécule d'oxyde nitrique (NO). Cette modification post traductionnelle est susceptible de changer la conformation protéique et donc d'affecter ses fonctions [<sup>119</sup>].

Il existe par ailleurs, des régulateurs négatifs qui induisent la dégradation de HIF-1 $\alpha$  de manière O<sub>2</sub>- indépendante. Ils consistent en des facteurs cellulaires particuliers comme le calcium ou la présence de facteurs de croissances [<sup>120</sup>].

### 2.1.2.4 REGULATION PAR LES NO :

Le Nitric oxide (NO) est un médiateur de la réponse inflammatoire secrété par des macrophages et des granulocytes activés [<sup>121</sup>]. L'impact d'une augmentation de NO sur l'activité des complexes HIF est complexe.

Certains groupes ont montré que le NO pouvait stimuler la dégradation de la protéine HIF-1 $\alpha$  en activant les PHDs [<sup>112</sup>, <sup>122</sup>, <sup>123</sup>].

D'autres ont montré que la S-nitrosylation de la Cys 800 de la protéine HIF-1 $\alpha$  pouvait mener à une augmentation de l'activité du complexe HIF-1 en augmentant son interaction avec p300 [124, 125]

#### 2.1.2.5 REGULATION PAR LES CYTOKINES:

Les cytokines sont un groupe de messagers induit au cours de la réponse inflammatoire. Parmi ces messagers, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  sont décrits comme activateur transcriptionnel de HIF-1 $\alpha$  [126], mais seul le TNF- $\alpha$  a été décrit comme capable d'induire une augmentation de la protéine HIF-1 $\alpha$  dans quelques modèles cellulaires [127]. L'activation de HIF-1 $\alpha$  par le TNF- $\alpha$  se fait via l'activation de plusieurs voies de signalisation incluant les ROS, la production de NO et Pi3K et/ou NF $\kappa$ B [112]. Il n'est encore pas très clair si d'autres cytokines sont capables d'induire HIF-1 $\alpha$ , néanmoins certaines petites molécules médiatrices du microenvironnement inflammatoire comme les adénosines par exemple semblent le faire [128].

#### 2.1.2.6 RÉGULATION EN RÉPONSE À UNE INFECTION :

Plusieurs études suggèrent un rôle de HIF-1 $\alpha$  dans les maladies infectieuses. De fait, HIF-1 et HIF-2 sont essentiels pour l'activité bactéricide des phagocytes et le contrôle de la dissémination systémique des bactéries chez les souris infectées [129, 130]. Certaines bactéries activent HIF-1 $\alpha$ , c'est le cas pour *Bartonella henselae* (qui est connue pour causer une maladie vasculoproliférative).

Cette activation a été observée en condition normoxique et nécessite l'adhésine A [131]. HIF-1 $\alpha$  est aussi activée en réponse aux infections par des Enterobacteriaceae comme *Yersinia enterocolitica*. Cette activation est le résultat d'une sécrétion de sidérophores bactériens qui consomment le fer intracellulaire [132]. Une étude réalisée sur des keratinocytes a mis en évidence une activation de HIF-1 $\alpha$  qui induit une expression de la cathelicidine (un peptide antimicrobien) médiant une protection contre un groupe de *A Streptococci* gram positif [130].



Une autre étude effectuée sur les cellules épithéliales gastriques infectées par *Helicobacter pylori* a démontré une activation de HIF-1 $\alpha$  via l'activation de la voie des MAPK ainsi que la voie NF $\kappa$ B [<sup>133</sup>].

Enfin, une étude effectuée au sein de mon laboratoire d'accueil a mis en évidence que la souche d'*E.coli* C1845 appartenant à la famille des « Diffusely Adhering *E.coli* » (DAEC) est capable d'induire la synthèse de la protéine HIF-1 $\alpha$  dans des cellules épithéliales intestinales.

Le mécanisme d'induction passe par la fixation de l'adhésine F1845, facteur de virulence de ces bactéries, au récepteur membranaire DAF initiant ainsi l'activation d'une série de voies de signalisation intracellulaire incluant la voie PI3K/AKT et MEK/ERK qui entraînent une activation du facteur d'initiation ribosomal S6 permettant ainsi la synthèse de HIF-1 $\alpha$  [<sup>134</sup>].

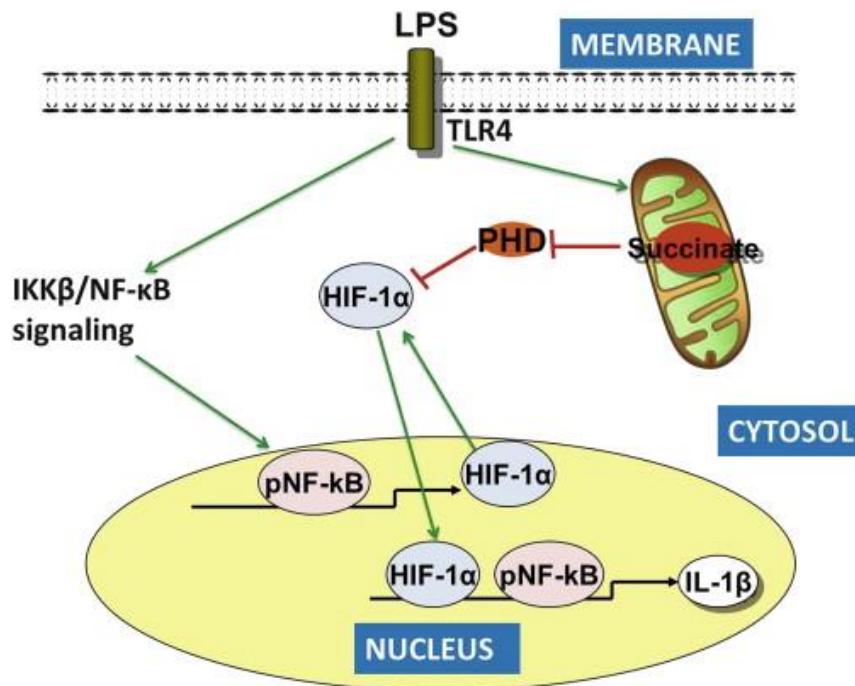
Le Lipopolysaccharide (LPS) est un composant de la paroi des bactéries gram négatives qui a été démontré comme capable d'induire l'expression de HIF-1 $\alpha$  dans des macrophages et des monocytes infectés [<sup>135</sup>; <sup>136</sup>]. L'activation de HIF-1 en réponse au LPS est de nature transcriptionnelle (elle est inhibée par l'Actinomycine D). Elle implique essentiellement la voie des MAPK/NF $\kappa$ B. En effet il a été reporté une augmentation de la phosphorylation de p42/44 MAPK ainsi qu'une diminution de l'expression de HIF-1 $\alpha$  suite à un traitement par un inhibiteur de p42/44 MAPK [<sup>136</sup>].

Il est à noter que l'activation LPS-dépendante de HIF-1 $\alpha$  n'a pas été observée dans des modèles d'infection de cellules épithéliales ou endothéliales [<sup>131</sup>, <sup>132</sup>]. De plus, les mécanismes impliqués dans la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les macrophages activés sont encore à élucider.

Une étude récente d'O'Neil et collègues propose que le succinate (un métabolite intermédiaire du cycle mitochondrial de l'acide tricarboxylique) s'accumule dans les macrophages activés par le LPS et que son accumulation stabilise HIF-1 $\alpha$  qui, en retour, active la transcription de l'IL-1 $\beta$  pour initier l'immunité innée. [<sup>137</sup>].

**Figure 15 : Induction de HIF-1 $\alpha$  en réponse au LPS.**

[Adapté de <sup>137</sup>]



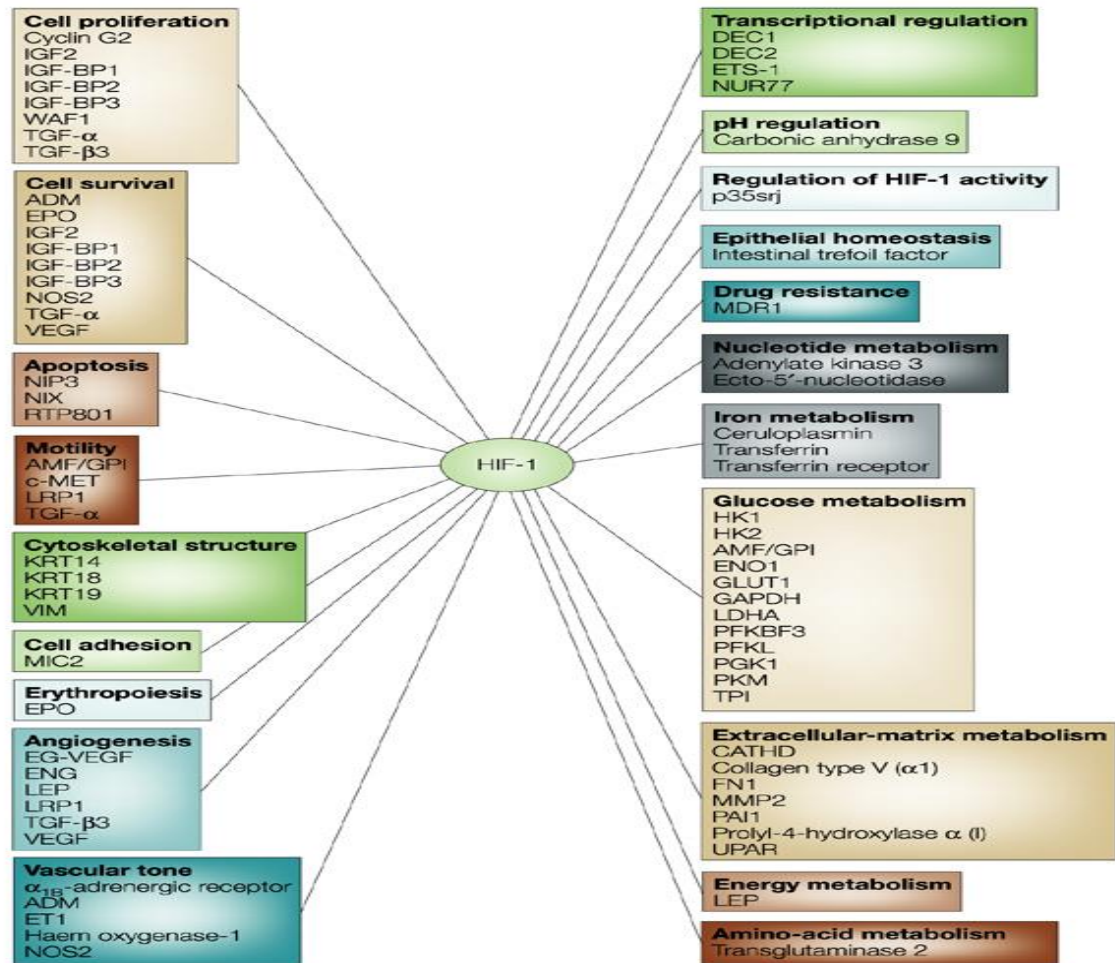
Lorsque les macrophages sont activés par le LPS, via le récepteur TLR4, une reprogrammation métabolique se fait conduisant à une accumulation de succinate. Le succinate aurait un effet inhibiteur des PHDs ce qui va conduire à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . Le LPS active aussi les voies MAPK/NF- $\kappa$ B et HIF-1 $\alpha$  qui vont induire la transcription de différents gènes dont IL-1 $\beta$  qui code pour une cytokine pro-inflammatoire.

Dans un contexte infectieux, HIF-1 peut être induit par des bactéries pathogènes mais aussi par des virus [<sup>138</sup>, <sup>139</sup>, <sup>140</sup>], des champignons et des métazoaires.

## 2.2 FONCTIONS CELLULAIRES RÉGULÉES PAR HIF:

HIF contrôle l'expression d'une multitude de gènes (**Figure 16**) impliqués dans la glycolyse, le métabolisme, le cycle cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse. [<sup>141</sup>].

Figure 16 : Gènes régulés par HIF et processus cellulaires associés  
[<sup>141</sup>]



Nature Reviews | Cancer

Représenté ci-dessus, les différents gènes induits par HIF-1 et les processus cellulaires dans lesquels ils sont impliqués.

### 2.2.1 HIF ET INFLAMMATION

Comme cité précédemment, l'intestin présente un profil d'oxygénation particulier où certaines zones sont hypoxiques (Chapitre 2.1). Chez un patient MICI, toute la muqueuse intestinale lésée devient sévèrement hypoxique [<sup>142</sup>].

En effet, il a été montré que des biopsies prélevées chez des patients atteints de MICI présentent de très forts niveaux de HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  [<sup>143</sup>]. De plus, la multiplication de pathogènes intracellulaires induit une hypoxie dans les cellules infectées [<sup>144</sup>].

Les modèles de souris qui miment une inflammation chronique intestinale ont été largement utilisés pour mettre en évidence le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans ce processus. Un rôle protecteur de HIF-1 $\alpha$  a été décrit dans des études où les souris sont traitées avec des inhibiteurs pharmacologiques des PHDs [<sup>145</sup>; <sup>146</sup>]. De même, un rôle essentiel de HIF-1 $\alpha$  dans le maintien de la barrière intestinale après l'inflammation a été suggéré par plusieurs équipes [<sup>142</sup>; <sup>147</sup>]. Des études réalisées avec des modèles cellulaires ont souligné ce rôle [<sup>92</sup>; <sup>148</sup>; <sup>149</sup>]. Néanmoins, ces données sont encore controversées puisqu'il a été montré que la signalisation dépendante de HIF-1 $\alpha$  induisait l'augmentation d'un panel de gènes associé à l'inflammation [<sup>150</sup>]. De manière intéressante, une étude de 2013 basée sur différents modèles de souris ayant une colite induite a démontré que HIF-2 $\alpha$  est fortement activé au niveau des cellules épithéliales. Cette activation entraîne l'augmentation d'expression des médiateurs proinflammatoires épithéliaux qui sont essentiels à l'initiation et la progression de MICI [<sup>151</sup>]. De plus, l'inflammation chronique observée dans les MICI provoque une anémie appelée « Anemia of Chronic Disease » (ACD) [<sup>152</sup>]. Cette anémie est due en partie à l'augmentation de l'expression de l'Hepcidine (hormone qui réduit l'apport ferrique en induisant son stockage par les macrophages en autre). HIF-1 jouerait indirectement un rôle inhibiteur dans

l'expression de l'Hepcidine [<sup>153</sup>]. Des études très récentes impliquent plus précisément HIF-2 dans la régulation de l'homéostasie du fer au niveau de la muqueuse intestinale [<sup>154</sup>].

Enfin, les rôles différents des protéines HIF expliqueraient donc les rôles contradictoires cités ci-dessus. De ce fait, le rôle précis des HIFs dans l'inflammation n'est toujours pas élucidé.

### 2.2.2 HIF ET ANGIOGENÈSE:

L'angiogenèse est le processus intracellulaire permettant la néovascularisation des tissus à partir de vaisseaux préexistants. Elle est induite au cours de l'inflammation et de la tumorigenèse [<sup>155</sup>] en réponse à une hypoxie qui s'installe au niveau des tissus inflammatoires et tumoraux. HIF-1 $\alpha$  active directement l'expression du facteur pro-angiogénique « vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) ainsi que ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR 2. Depuis plus d'une décennie, plusieurs modèles de souris ont été utilisés pour étudier le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans l'induction de l'angiogenèse. [<sup>91</sup>; <sup>156</sup>].

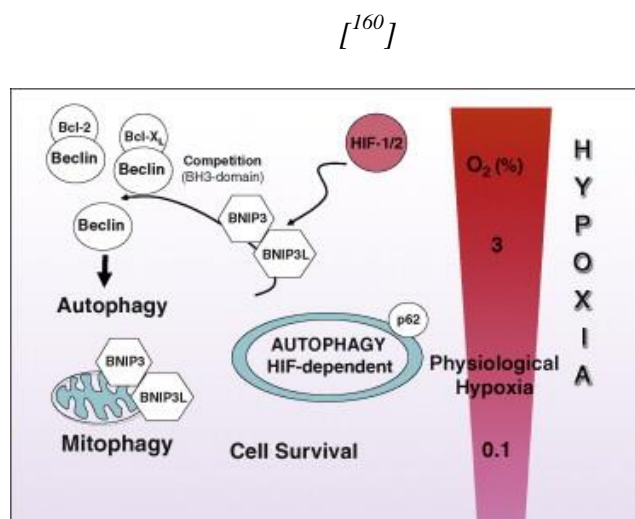
Et encore plusieurs études très récentes implique de nouveaux facteurs qui jouent un rôle dans cette induction HIF-1 $\alpha$  dépendante comme les « high-density lipoproteins » (HDLs) [<sup>184</sup>] et l'«anterior gradient protein 2 » (AGFR2).

### 2.2.3 HIF ET AUTOPHAGIE:

L'autophagie (chapitre 4.2) est un mécanisme de dégradation intracellulaire qui est activé par une hypoxie prolongée ou une ischémie sévère suivie d'une ré-oxygénation [<sup>157</sup>].

Cette activation se fait via HIF-1 qui induit « BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 » (BNIP3) et BNIP3L. D'une part, BNIP3 est une BH3-only protéine caractérisée pour son rôle pro apoptotique [<sup>158</sup>] et BNIP3L est une BH3-only protéine de la famille des Bcl2 qui est induite par l'hypoxie. D'autre part, Beclin-1 est aussi une BH3-only protéine connue pour interagir avec Bcl2 ou Bcl-xL contrôlant ainsi la balance entre apoptose et autophagie [<sup>159</sup>]. Le modèle actuel proposé pour le mécanisme d'induction de l'autophagie par HIF-1 via BNIP3/BNIP3L est que les domaines BH3 de ces protéines sont déterminants dans le déplacement de l'équilibre des complexes de Bcl2/Beclin1 ou Bcl-XL/Beclin 1. La liaison de BNIP/BNIP3L avec Bcl2/Bcl-XL entraîne la libération de Beclin 1 qui induit alors l'autophagie (**Figure 17**).

**Figure 17 : Modèle d'induction de l'autophagie par HIF-1**



*L'expression de BNIP3/BNIP3L est induite par HIF-1α. BNIP3/BNIP3L qui a une plus grande affinité pour Bcl-2/Bcl-XL permet la libération de Beclin 1 qui induit l'autophagie.*

### 3 *Escherichia coli* entéropathogènes :

#### 3.1 ENTÉROBACTÉRIES:

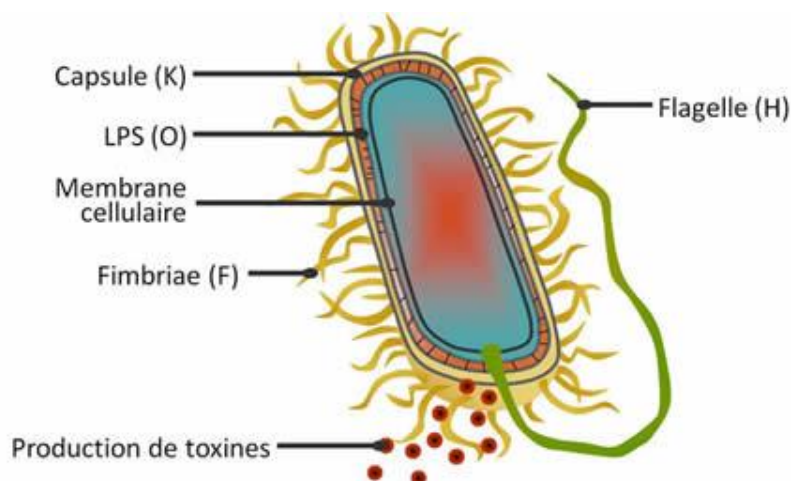
Les *E. coli* entéropathogènes sont des bacilles Gram négatif qui appartiennent à la famille des entérobactéries. Les entérobactéries sont des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives qui colonisent différents milieux du sol, de l'eau ainsi que les intestins de plusieurs mammifères, dont l'homme. Les différentes espèces bactériennes de cette famille sont identifiables grâce à des antigènes communs à toutes mais dont la composition est spécifiques à chacune (**Figure 18**):

-L'antigène O : endotoxine de nature lipopolisaccharidique constituant de la paroi bactérienne. Il est capable de provoquer fièvre et complications chez l'organisme infecté.

-L'antigène H : de nature protéique non toxique, constituant du flagelle, commun à toutes les entérobactéries mobiles.

- L'antigène K: entoure la paroi de certaines espèces, appelé antigène de surface ou d'enveloppe.

**Figure 18 : Les antigènes entérobactériens**



*Réprésentation schématique des différents antigènes permettant d'identifier les différentes souches d'E coli entéropathogènes. Le pili de type 1 est appelé aussi « Fimbriae », il confère une capacité adhésive. Le flagelle est impliqué dans l'invasion.*

Les entérobactéries se divisent rapidement, sont retrouvés en abondance dans l'intestin et présentent une résistance à un large spectre d'antibiotiques. Ces bactéries sont souvent liées à des pathologies humaines et elles peuvent être subdivisées en deux sous-groupes :

**Les entérobactéries non pathogènes** : retrouvées dans la flore commensale habituelle de l'Homme et des animaux, elles sont fréquentes dans des infections extra-intestinales et urinaires. Elles regroupent principalement *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Morganella*.

**Les entérobactéries pathogènes** : Extra- intestinales qui lorsqu'elles sont ingérées provoquent des infections intestinales, comme *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* et certaines souches d'*Escherichia coli* (*E.coli* extraintestinales ExPECs et des *E.coli* entéropathogènes EPEC) [<sup>161</sup>].

### 3.1.1 *E. COLI* COMMENSALES :

La majorité des *E.coli*, qui représente 80% la flore intestinale de l'être humain sont des bactéries non pathogènes. La colonisation de l'intestin de l'Homme se fait dès les premiers instants de sa venue au monde [<sup>162</sup>]. Les *E. coli* commensales nichent au niveau du mucus dans le colon. Elles ne franchissent cette barrière qu'en cas de dysfonctionnement de la barrière gastro-intestinale comme chez des patients MICI par exemple et causent rarement des maladies [<sup>162</sup>].

### 3.1.2 *E. COLI* ENTÉROPATHOGENES:

Cependant un petit groupe de ces *E.coli* ont acquis des facteurs de virulences qui leurs ont permis de coloniser de nouvelles niches. Ces *E. coli* sont ainsi devenues capables de causer



des diarrhées, des gastro-entérites et des infections urinaires. Il existe six groupes distincts d'*E.coli* pathogènes: les *E. coli* entérohémorragiques (ECEH), les *E. coli* entérotoxigéniques (ECET), les *E. coli* entéroaggrégatives (ECEAgg), les *E. coli* Entéroinvasives (ECEI), les *E. coli* à adhérence diffuse (ECAD) et les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) [<sup>162</sup>].

#### 3.1.2.1 *E. COLI* ADHÉRENTES:

Tous les groupes d'*E.coli* entéropathogènes expriment des facteurs de virulences qui leur permettent de coloniser les cellules. Mise à part les ECEI qui sont capables d'envahir les cellules, les cinq autres groupes restent extra cellulaires et envahissent la surface. Des structures morphologiquement spécifiques de chaque espèce sont exprimées à la surface de ces bactéries et leur permettent d'adhérer aux cellules. Ces structures sont formées d'adhésines de classes différentes (classe I, II, IV et dont la classification évolue encore). Elles sont appelées pili ou fimbriae [<sup>162</sup>].

Les deux groupes EPEC et EHEC se caractérisent par les lésions d'Attachement et d'Effacement (A/E) qu'elles causent au contact des cellules épithéliales intestinales (**Figure 16**). A l'endroit où se fixe la bactérie, les microvillosités des entérocytes subissent un effacement.

Cette stratégie d'A/E est possible grâce à la capacité qu'ont ces bactéries à manipuler le cytosquelette d'actine des cellules à leur profit. Et ceci se fait via la sécrétion de plusieurs protéines bactériennes :

Le « Translocated Intimin Receptor » (Tir) est le point d'ancrage qui est inséré dans la membrane plasmique de la cellule. Il est injecté dans les cellules cibles par « l'EPEC-secreted protein ». Une fois les Tir insérés, l'intimine, une protéine de la membrane bactérienne, se fixe à ce dernier et adhère aux entérocytes. Cette protéine induit ensuite une agglomération de

l'actine cellulaire autour des microvillosités formant ainsi une structure en piédestal pour la bactérie (**Figure 19**).

**Figure 19 : Aspect histopathologique des lésions A/E**  
[<sup>162</sup>].



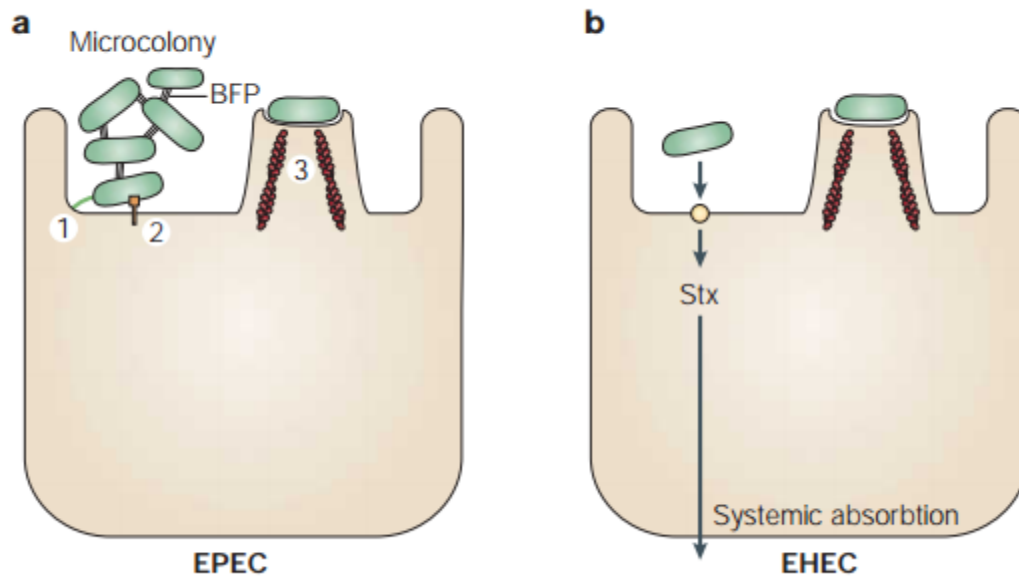
*Les bactéries de types EPEC ou EHEC en rouge sont entourées par la structure en piédestal d'actine entérocytaires.*

Le « type III secretion system » (T3SS) composé d'au moins 30 protéines différentes est le système de sécrétion qui permet l'injection des protéines effectrices au sein des cellules infectées [ <sup>163</sup>].

En conclusion, il existe une spécificité d'interaction entre bactéries et cellules. Cette spécificité se fait au niveau des récepteurs cellulaires et des adhésines bactériennes (**Figure 20**).

**Figure 20 : Stratégies d'adhérence des EPEC et EHEC**

[Adapté de <sup>162</sup>]



(a) Les EPEC adhèrent aux entérocytes en détruisant l'architecture des microvillosités induisant les lésions A/E. Ce réarrangement du cytosquelette cellulaire est accompagné d'une réponse inflammatoire et d'une diarrhée. 1. Adhésion ; 2. Translocation des protéines via le T3SS ; 3. formation du piédestal.

(b) Les EHEC induisent aussi des lésions A/E mais se distinguent par la sécrétion de la « Shiga toxin » (Stx) qui lorsqu'elle pénètre dans les cellules peut conduire à des complications potentiellement létales pour l'hôte.

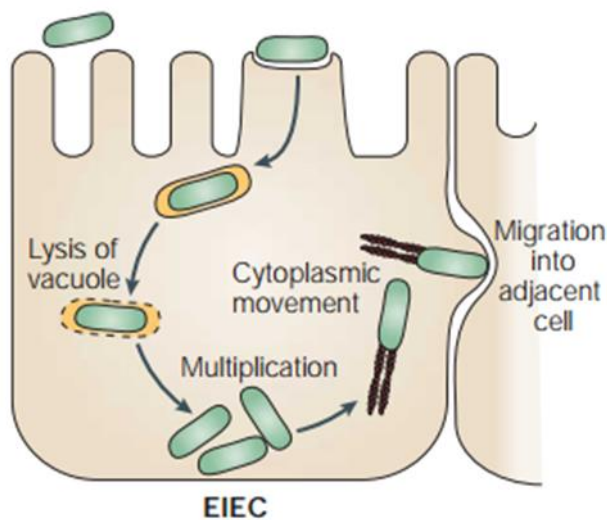
### 3.1.2.2 E. COLI INVASIVES:

Des bactéries capables d'envahir le cytoplasme cellulaire après adhésion à la surface dernière sont dites invasives. Les EIEC font partie de ce type de bactéries ; elles adhèrent aux entérocytes et sont internalisées. Une fois à l'intérieur des cellules, elles lysent la membrane de la vacuole d'entrée et elles induisent la polymérisation d'actine cellulaire au niveau d'une de leurs extrémités. Ce détournement de l'actine intracellulaire leur confère une motilité qui

leur permet d'envahir les cellules adjacentes. Ce mécanisme est similaire à celui utilisé par *Shigella flexneri*.

**Figure 21 : Stratégie invasive des EIEC**

[<sup>162</sup>]



*Les EIEC adhèrent et envahissent les cellules épithéliales du colon. Elles lysent la vacuole d'internalisation et traversent la cellule via les filaments d'actines recrutés pour infecter les cellules adjacentes.*

### 3.2 LES E COLI ADHÉRENTES ET INVASIVES (AIEC) :

#### 3.2.1 FACTEURS BACTÉRIENS

Aujourd'hui, deux nouvelles souches d'*E. coli* entéropathogènes invasives ont été identifiées. Les « Shiga toxin producing Enteroaggregative *E. coli* » (STEAEC) et les *E.coli* adhérentes et invasives (AIEC) [<sup>164</sup>] sur lesquelles je vais plus particulièrement me concentrer.

Les AIEC ont été isolées à partir de lésions iléales de patients MC [<sup>165</sup>; <sup>68</sup>; <sup>166</sup>; <sup>70</sup>; <sup>167</sup>]. Les AIEC ont tout d'abord été décrites comme capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales [<sup>68</sup>; <sup>166</sup>; <sup>167</sup>]. La souche d'AIEC LF82 est la première à avoir été identifiée et étudiée, elle représente donc la souche type de cette famille de bactérie. Les AIEC présentent une capacité adhésive et invasive à la muqueuse intestinale qui est unique. Les facteurs de virulences de ces bactéries sont différents de celles des *E. coli* décrites plus haut (chapitre 3.1.2). Une étude basée sur une stratégie de mutagenèse aléatoire par insertion aléatoire d'un transposon Tn5*phoA* a permis de caractériser ces différents facteurs [<sup>168</sup>].

Ainsi on retrouve:

- Les pili de type 1 : L'expression de ces derniers par la souche LF82 la différencie de la souche non pathogène de référence K12 (**Figure 22**).

Ils facilitent l'invasion des cellules épithéliales intestinales en induisant des elongations à la surface des leurs membranes facilitant ainsi leur propre internalisation [<sup>169</sup>].

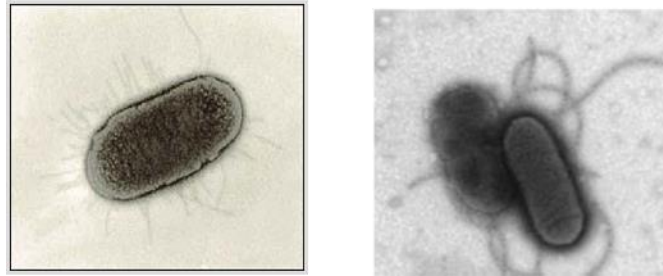
- les flagelles : La mutation d'un ou des deux gènes *flhD* et *fliA* qui codent pour FlhD2C2 et FliA, des régulateurs majeurs de la synthèse flagellaire chez AIEC LF82 inhibe la capacité d'adhérence et d'invasion des cellules épithéliales intestinales [<sup>170</sup>].

- la lipoprotéine NlpI : Un mutant LF82 délété pour cette protéine n'exprime pas de flagelle et très peu de pili de type 1. Ce mutant présente des capacités d'adhérence et d'invasion faible comparé à la souche contrôle [<sup>70</sup>].

- la protéine de membrane externe YfgL : En absence de la protéine YfgL, les AIEC LF82 sont incapables de produire des « Outer Membrane Vesicle » (OMV) qui sont importante pour le processus d'invasion [<sup>168</sup>].

- les protéines externes OmpA et OmpC : protéines structurales des OMV.

**Figure 22 : *E. coli* K12 à droite versus AIEC LF82 à gauche.**



*Une souche AIEC LF82 diffère d'une souche E.coli K12 non virulente par l'expression de facteurs de pathogénicité spécifiques. Les pili de type 1 qui entourent la bactérie et dont la densité est visible par le halo noir qu'ils forment et les flagelles moins dense que les pili de type 1 et beaucoup plus longs. Ces deux facteurs de virulences sont les plus importants car ils permettent aux AIEC LF82 d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales en se liant à des récepteurs spécifiques.*

### 3.2.2 FACTEURS CELLULAIRES

Les AIEC LF82 sont capables non seulement d'envahir mais aussi de survivre et de se multiplier dans des cellules épithéliales, les macrophages [<sup>169</sup>; <sup>170</sup>] et les neutrophiles [<sup>171</sup>]. Cette capacité est possible grâce au régulateur transcriptionnel OmpR qui contrôle l'expression de gènes cibles. La délétion d'*ompR* dans la souche AIEC LF82 génère un mutant non virulent dont les capacités d'adhérence et d'invasion aux cellules épithéliales intestinales sont largement diminuées. L'*ompR* contrôle aussi l'expression de la protéine OmpC, du pili de type 1 et du flagelle [<sup>172</sup>].

De plus, une étude réalisée avec un mutant isogénique AIEC LF82 délété du gène *fliC* (codant la flagelline FliC), montre qu'il n'est plus capable d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales en culture. D'autre part, ce mutant ne synthétise plus de pili de type 1.

Ceci est la preuve qu'il existe une co-régulation de la synthèse des pili de type 1 et des flagelles. La restauration de l'expression des pili de type 1 chez le mutant LF82- $\Delta$ *fliC* par transformation de ce mutant avec un plasmide recombinant codant l'opéron *fim* ne restaure pas totalement les niveaux d'adhésion et d'invasion. Une étape de centrifugation permet de restaurer totalement l'adhésion, mais pas l'invasion, de ce même mutant [<sup>170</sup>].

L'adhérence des AIEC aux entérocytes se fait via le récepteur CEACAM6 qui est exprimé à la surface des bordures en brosse de ces cellules. Il est surexprimé au niveau de l'intestin des patients qui souffrent de la MC. Cette adhérence se fait via la liaison du pili de type 1 et on retrouve les AIEC en plus grande densité chez les patients MC [<sup>70</sup>]. L'implication du récepteur CEACAM6 dans l'adhérence des AIEC a été confirmée grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre cette protéine d'adhérence. Brièvement, les auteurs ont démontré que l'incubation d'entérocytes de patients MC avec un anticorps anti CEACAM6 réduisait la capacité d'adhérence des AIEC aux cellules épithéliales alors que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre CEACAM5 n'avait aucun effet [<sup>70</sup>]. De façon tout à fait intéressante il a été montré que les cytokines inflammatoires TNF- $\alpha$  et INF- $\gamma$  induisent une sur expression de CEACAM6 au niveau des cellules épithéliales intestinales [<sup>173</sup>]. Ces résultats expliquent comment un état inflammatoire favorise l'infection par les AIEC.

La flagelline est un composant bactérien exprimé chez les souches d'*E. coli* pathogènes et non pathogènes. Une étude de la régulation de l'expression de ce facteur par le système EnvZ/OmpR (EnvZ est un senseur d'osmolarité qui phosphoryle OmpR) a permis de démontrer qu'une différence de régulation de la flagelline serait à l'origine de la différence de pathogénicité. En effet, les AIEC LF82 seraient hyper flagellées comparé aux *E.coli* K12 qui seraient hypo flagellées ou non flagellées [<sup>172</sup>]. De plus, la flagelline joue un rôle important dans le développement et la progression des colites induites par le DSS chez les souris [<sup>174</sup>]. Une étude basée sur l'infection d'un modèle de souris à colite induite avec deux mutants AIEC LF82 (LF82- $\Delta$ *fliC* qui n'exprime pas de flagelles et LF82- *OmpR*-negatif), a montré

que ces souris ne présentaient pas d'exacerbation de la colite contrairement à celles infectées par la souche LF82 sauvage. Cet effet est dépendant de la flagelline car la restauration de son expression chez le mutant LF82- $\Delta$ *fliC* a restauré son habilité à exacerber les symptômes de la colite induite chez les souris [240].

Les flagelles jouent donc un rôle dans le processus d'invasion, soit directement comme appareil de sécrétion pour des facteurs de virulence intervenant dans l'invasion, comme déjà rapporté chez *Campylobacter spp.* [175], soit indirectement en contrôlant l'expression de facteurs de virulence autres que les pili de type 1.

Les récepteurs TLR5 sont ceux qui reconnaissent la flagelline des AIEC tandis que les récepteurs NODs reconnaissent le PNG de ces dernières [19]. En réponse à la flagelline, TLR5 active les voies MAPK et NF $\kappa$ B induisant l'expression de l'IL-8 et de la « macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  » (MIP3 $\alpha$ ) [176]. Enfin, de manière intéressante, des études réalisées avec différentes bactéries démontrent que l'expression de ce récepteur est transcriptionnellement régulée par la flagelline [177].

### 3.2.3 AIEC ET MICI

Comme cité précédemment, les AIEC LF82 ont été isolées chez des patients qui souffrent de MC. En effet, cette souche a été retrouvée avec une densité de 36.4% dans l'iléon des patients MC alors qu'elle ne dépasse pas les 6,2% chez les sujets sains [167]. Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle des AIEC LF82 dans l'inflammation de la muqueuse intestinale.

Tout d'abord, l'infection d'une monocouche de cellules polarisées par la souche AIEC LF82 entraîne la rupture des jonctions serrées ce qui augmente la perméabilité de la barrière



épithéliale [<sup>178</sup>; <sup>179</sup>.] et cette rupture favorise la transmigration des neutrophiles et des cellules dendritiques.

Ensuite, les macrophages infectés par les AIEC LF82 sécrètent des taux élevés de TNF $\alpha$  [<sup>169</sup>] et ce niveau de TNF est corrélé avec la multiplication des AIEC dans les phagolysosomes [<sup>180</sup>]. De plus les cellules épithéliales intestinales infectées par les AIEC sécrètent un taux élevé d'IL8 et de CCL20, deux cytokines qui attirent les neutrophiles, cellules décrites comme la première ligne de défense contre les microbes [<sup>181</sup>].

Les AIEC ont donc la capacité d'envahir la muqueuse intestinale, d'attirer des cellules immunitaires qu'elles peuvent infecter à leur tour et induire indirectement la sécrétion de cytokines inflammatoires. Tout ceci appuie fortement un rôle de ces bactéries dans la pathogenèse des MICI par l'induction et l'entretien d'une boucle d'amplification de la inflammatoire au niveau de la muqueuse intestinale des patients.

#### **4        *Mécanismes de défenses de l'hôte :***

Une cellule eucaryote représente une cible pour des pathogènes de toute sorte. Pour lutter contre les attaques microbiennes, la cellule eucaryote a développé différents processus intracellulaires lui permettant de se défendre en cas d'intrusion. Ces mécanismes comprennent la détection, l'internalisation et la dégradation des microbes. Nous verrons que chacune de ces étapes fait intervenir des vésicules spécifiques. En contrepartie, les microbes tels que les bactéries, des pathogènes qui évoluent très vite, développent des mécanismes spécifiques leur permettant de contrer les mécanismes de défenses cellulaires.

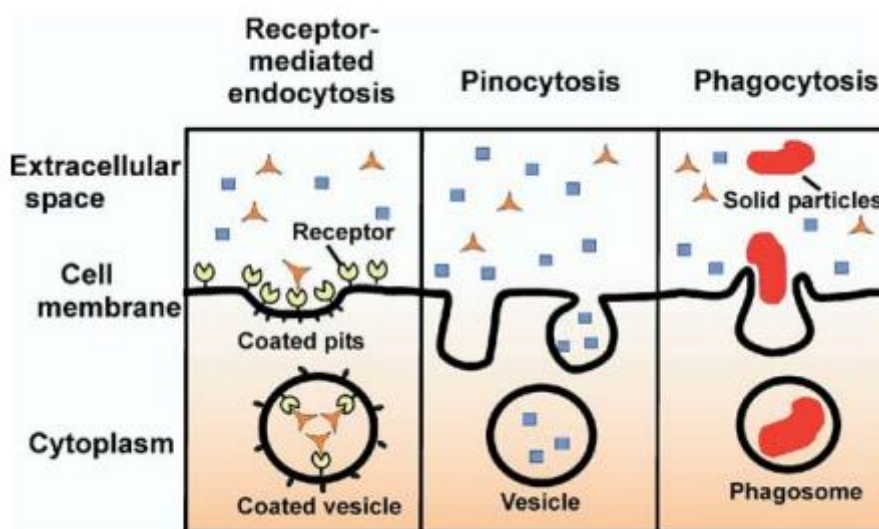
##### **4.1 INTERNALISATION DE MATÉRIEL EXTRACELLULAIRE:**

###### **4.1.1 ENDOCYTOSE :**

L'internalisation de matériel extracellulaire par une cellule est appelé endocytose. C'est un processus qui met en jeu des structures membranaires spécifiques en fonction du corps internalisé. L'endocytose se divise en trois mécanismes (**Figure 23**) :

**Figure 23 : Les trois types d'endocytose**

[<sup>182</sup>]



*Le type d'endocytose le mieux caractérisé est l'endocytose des récepteurs. La liaison des molécules spécifiques aux récepteurs induit le recrutement d'un réseau complexe de protéines impliquant notamment les clathrines (« coated pits ») qui vont se polymériser et entraîner l'invagination de la membrane cellulaire. Cette invagination va donner naissance à une vésicule entourée d'un manteau protéique (« coated vesicle ») qu'elle perdra lors de sa maturation.*

*La pinocytose permet l'ingestion de fluides ou de macromolécules extracellulaires par formation de petites vésicules de 150nm de diamètre.*

*La phagocytose permet l'internalisation de grosses particules, voir même des cellules, grâce à des vésicules toujours supérieures à 250nm de diamètre que l'on nomme les phagosomes.*

#### 4.1.2 PHAGOCYTOSE :

Découvert par Metchnikov en 1882, la phagocytose constitue un élément essentiel de la réponse immunitaire innée partagée par les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. La phagocytose est un mécanisme vital à l'homéostasie de l'organisme. Elle permet essentiellement l'ingestion de cellules apoptotiques induisant une réponse anti-inflammatoire et des pathogènes cellulaires induisant une réponse inflammatoire [183]. La phagocytose joue un double rôle dans la réponse immunitaire. D'une part, elle assure la dégradation de pathogène dans l'immunité innée et d'une autre part, elle joue un rôle dans le processus de présentation des antigènes dans l'immunité adaptative [184].

La détection des pathogènes par les cellules phagocytaires se fait via le mécanisme de liaison des PRRs et PAMPs. Parmi les PRRs impliqués dans l'induction de la phagocytose, il y a les TLRs (décrit chapitre 1.2.2.2) mais aussi les récepteurs mannose (MR), les lectines, les récepteurs scavengers (SR) et les CD14 [185].

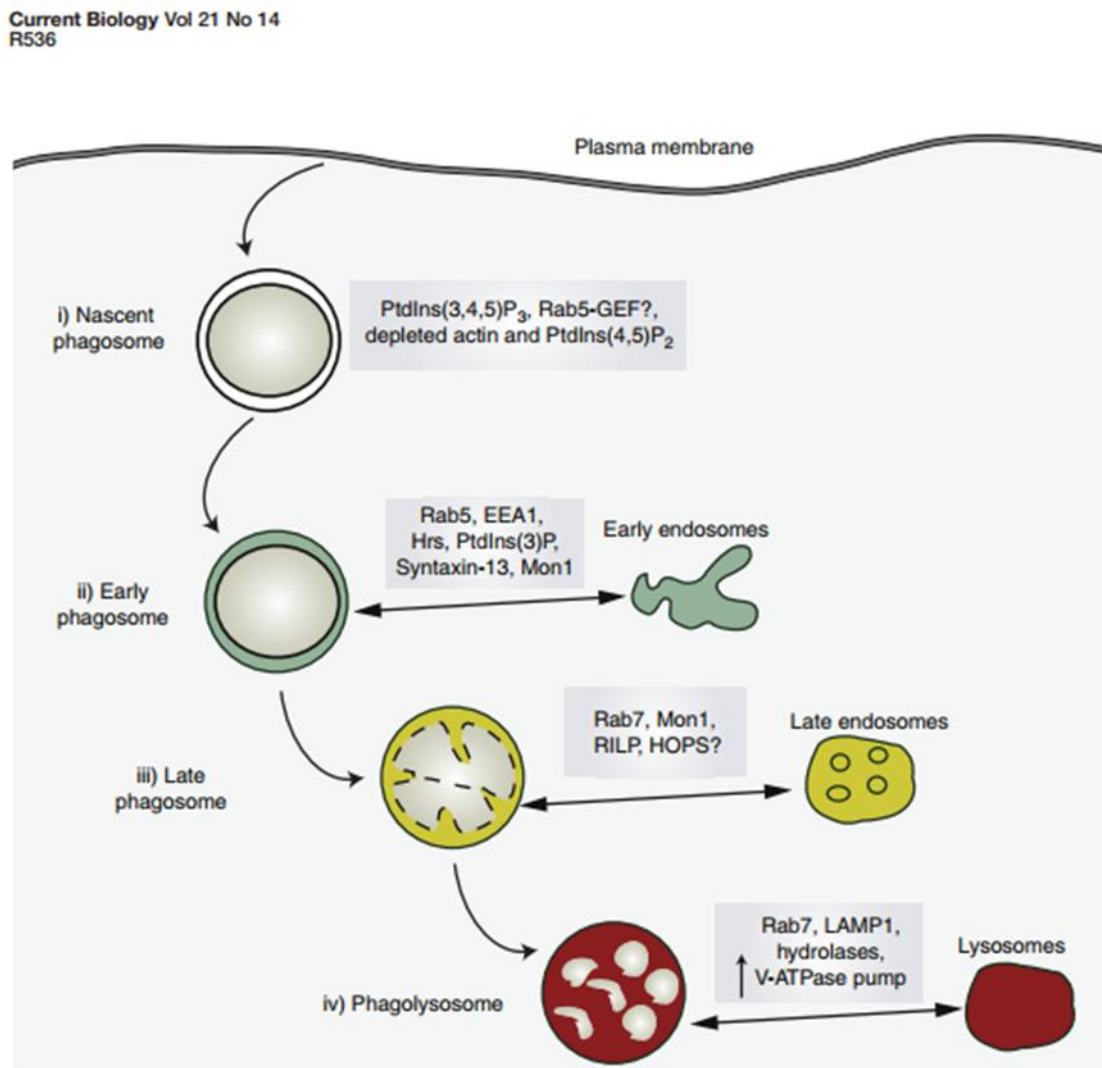
Les PAMPs détectés par ces récepteurs sont les LPS, les PGN, les flagellines, l'ADN bactérien mais aussi l'ARN viral [Bianci 2007]. La reconnaissance d'un pathogène spécifique à la surface d'une cellule phagocytaire se fait grâce à la contribution de plusieurs récepteurs membranaires des différentes familles citées plus haut. Les TLRs jouent eux un rôle dans l'activation des phagocytes et dans le relargage des cytokines pro inflammatoires [186].

##### Maturation du Phagosome :

Le phagosome est l'unité fonctionnelle du processus phagocytaire, il se forme au niveau de la membrane suivant quatre étapes différentes. Chacune de ces étapes permet le recrutement de protéines particulières à la surface du phagosome qui permettent de définir son état de maturation (**Figure 24**).

**Figure 24 : Les différentes protéines impliquées dans la maturation du phagosome et de l'endosome**

[Adapté de <sup>187</sup>]



(i) un phagosome naissant possède une membrane similaire à la membrane avec cependant des différences notables : l'addition des phosphatidylinositol ( $\text{PtdIns}$ ) 3, 4 et 5 tri-phosphorylés ( $\text{P}_3$ ) ainsi que de la protéine Rab5-GEF, la déplétion  $\text{PtdIns}(4,5)$  bi-phosphorylé ( $\text{P}_2$ ) et de l'actine. (ii) au stade de phagosome précoce, le phagosome acquiert plusieurs marqueurs moléculaires de l'endosome précoce (dont les protéines Rab5 et EEA1) ainsi qu'un lumen mi-acide. (iii) le phagosome tardif arbore des marqueurs d'endosomes tardifs (Rab7, Mon1 etc) et un pH luminal acide (iv) les phagosomes matures fusionnent avec

*des lysosomes pour donner des phagolysosomes (LAMP-1, Rab7, V-ATPases etc) à pH très acide et riche d'hydrolases qui dégradent les particules internalisées.*

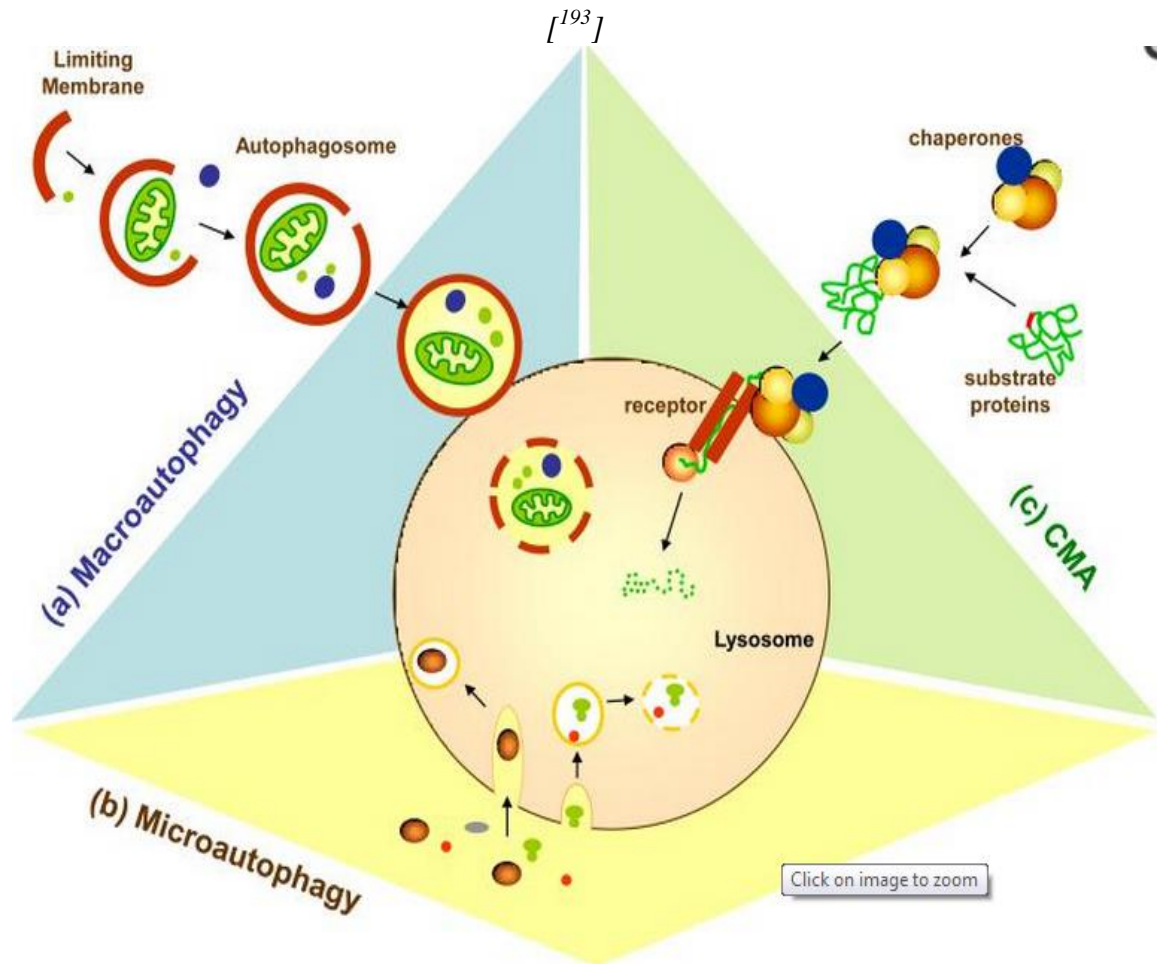
#### 4.2 AUTOPHAGIE:

##### 4.2.1 DÉFINITION :

L'autophagie est un processus de dégradation des protéines cellulaires via les lysosomes dont le rôle principal est le maintien de l'homéostasie cellulaire en recyclant des composés cellulaires [188]. Il existe trois types d'autophagie (**Figure 25**) :

- l'autophagie chaperonnes dépendante (CMA) : qui adresse les protéines cytosoliques au lysosome de manière directe [189; 190]
- la micro-autophagie : qui se fait par invagination de la membrane du lysosome en vue de dégrader des fragments cytosoliques [191].
- la macro-autophagie : qui est le plus souvent appelée autophagie et qui permet la séquestration de grosses portions cytoplasmiques dans des autophagosomes. Ces derniers fusionnent par la suite avec des lysosomes pour déclencher la dégradation de leur contenu [192].

Figure 25 : Les trois types d'autophagies



La macro-autophagie comprend différents sous-types d'autophagie :

- la mitophagie qui cible les mitochondries et qui est régulé par HIF-1 $\alpha$   $[^{194}]$ .
- la pexophagie qui cible les peroxysomes (organelles d'origine lipidique qui ont une fonction de détoxification des cellules eucaryotes)  $[^{195}]$
- la xénophagie qui cible les pathogènes dont les virus et les bactéries. C'est à ce dernier sous-type que je vais m'intéresser dans ce chapitre.

#### 4.2.2 MACHINERIE AUTOPHAGIQUE :

L'autophagie est régulée par un ensemble de gènes nommés les « Autophagy Related Genes » ATG qui ont été découvert en premier chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*  $[^{88}; ^{194}]$ .

L'autophagie est induite en réponse à différents stress (nutritif, hypoxique) ainsi qu'en réponse aux pathogènes (voir chapitre 4.1.4).

Ici je vais présenter les deux vésicules autophagiques dont la fusion permet d'assurer la fonction de dégradation autophagique.

#### Autophagosome :

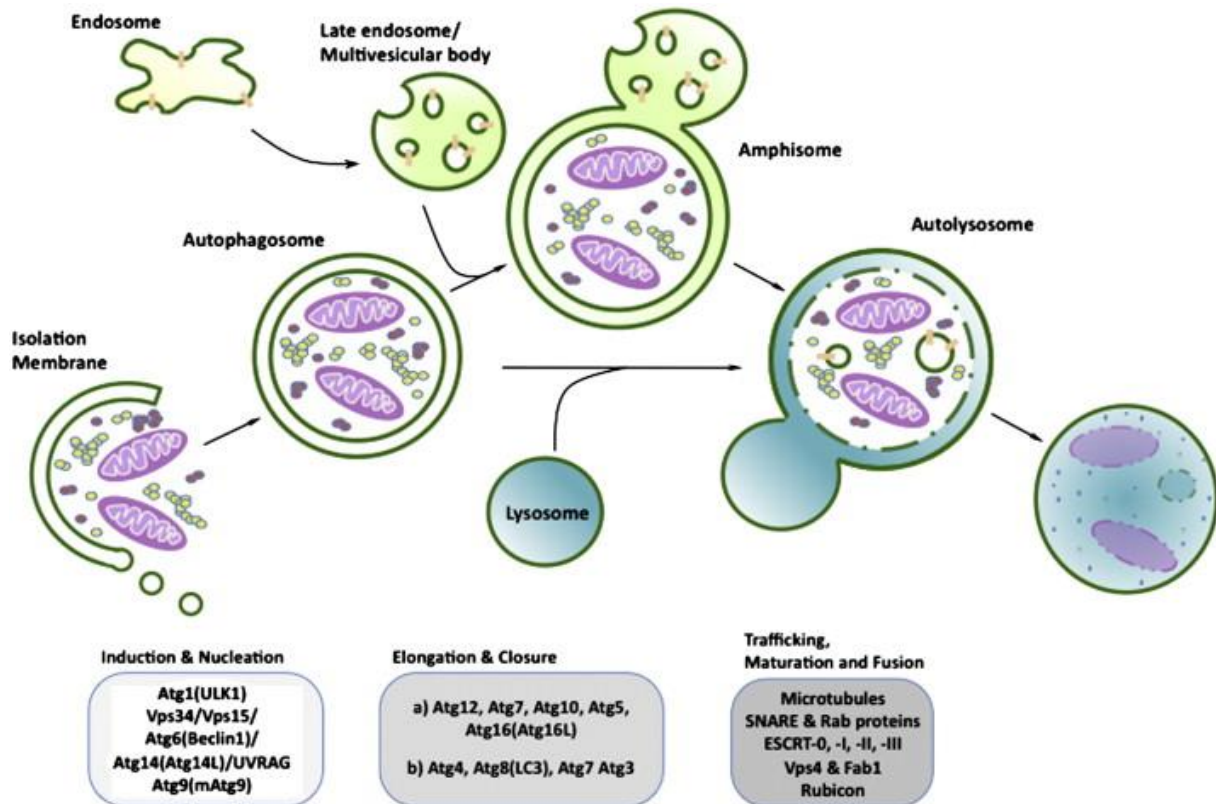
Chez les mammifères, l'autophagie est initiée par la formation de son unité fonctionnelle l'autophagosome. L'autophagosome est une vésicule intracellulaire formée de différentes couches lipidiques dont l'origine est probablement mixte incluant le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie [184]. La biogenèse de ce dernier ne requiert pas moins de 15 gènes *ATGs* majoritairement conservés de la levure à l'Homme [194]. La première étape du processus autophagique est l'initiation. Cette étape est régie par (ULK1) qui phosphoryle Beclin 1 et active la kinase Vps34 [196]. Le complexe Vps34/Beclin-1 [196] va recruter deux systèmes de conjugaison qui sont similaires à l'ubiquitinylation et la sumoylation. Le premier produit de conjugaison est le complexe Atg5-Atg12. Une fois formé, il permet le recrutement du deuxième qui est le produit de la conjugaison en carboxyterminal de la protéine Atg8 (LC3) par la phosphatidyléthanolamine (PE).

La liaison entre Atg8 et la PE est hydrolysée par Atg4 mais seule une fraction du complexe Atg8-PE reste associée à la membrane interne de l'autophagosome constituant un marqueur spécifique de cet organe. Ces deux étapes sont celle de l'élongation et la fermeture de l'autophagosome [197].

L'autophagosome ainsi formé pourra fusionner avec les endosomes précoces ou tardifs donnant un amphisome [198]. Il va suivre ensuite une étape dite de maturation dont l'évènement majeur est sa fusion avec un lysosome pour lui procurer les hydrolases

(cathepsines A,B,C et D) ainsi que le pH requis pour la dégradation de son contenu. (**Figure 26**).

**Figure 26 : Autophagie et autophagosome formation.**



*L'autophagie est un processus induit et inhibé en fonction des besoins cellulaires. C'est donc un mécanisme complexe hautement régulé faisant intervenir plusieurs protéines et complexes protéiques à chaque étape. Les différentes Atgs et autres protéines qui participent à cette régulation sont citées ci-dessus.*

### Lysosome :

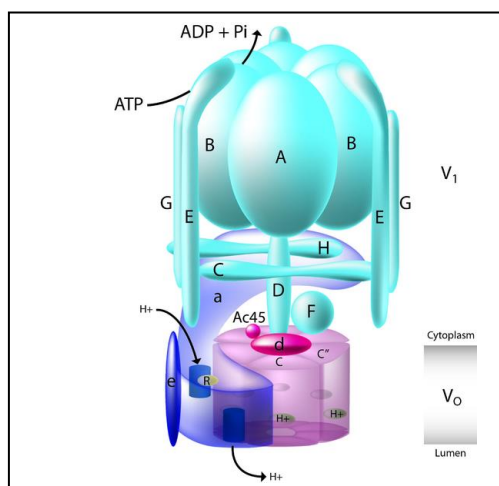
Le lysosome est une organelle ubiquitaire, caractérisée par un milieu acide ayant la capacité de se lier à d'autres vésicules intracellulaires. Il est crucial pour la dégradation et le recyclage des macromolécules délivrées par l'endocytose, la phagocytose et l'autophagie. Sa fonction est dépendante de ses hydrolases solubles appelées cathepsines dont le nom vient du grec



« kathépsein » ce qui signifie digérer. En plus des protéases ubiquitaires tels les Cathepsines D et E (uniquement présentes dans les endosomes), les plus importantes sont les cathepsines dites à cystéine. Chez l'homme, elles forment une famille d'au moins onze membres, appelées cathepsine A, C, D, F, H, J, K, L, L2, S et Z [199].

Les cathepsines sont actives en milieu acide. Cette particularité du milieu intra lysosomal est assurée entre autre, grâce à un complexe protéique transmembranaire la « Vacuolar-type H<sup>+</sup> ATPase » (V-ATPase) (**Figure 27**). Ces dernières, exprimées sur les endosomes, l'appareil de Golgi et bien entendu les lysosomes, assurent leur acidification. Le rôle de la V-ATPase dans le processus autophagique a été démontré grâce à son inhibition par la Bafylomycine A1 (un inhibiteur spécifique de la V-ATPase) [200]. De plus, cette acidification est importante pour la fusion des autophagosomes avec les lysosomes en plus de la dégradation des composés cytoplasmiques séquestrés [201].

**Figure 27 : V-ATPase et ses sous unité**



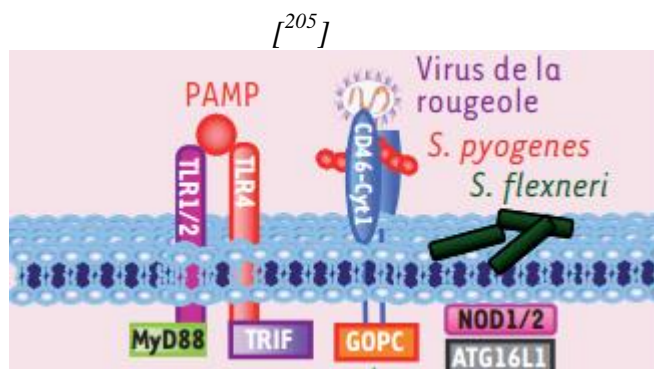
*La V-ATPase est constituée de 13 sous-unités qui forment deux domaines distincts. Le domaine V<sub>0</sub> regroupe les sous-unités A à H (avec trois copies des sous-unités A, B, E et G) associées à la membrane et le domaine V<sub>1</sub> regroupe les sous-unités a, d, c, c', c'' et e périphériques associées côté cytoplasmique. V<sub>1</sub> permet l'hydrolyse de l'ATP alors que V<sub>0</sub> est responsable de la translocation des protons. L'hydrolyse de l'ATP par la sous-unité*

catalytique (A ou B) induit une rotation de la tige composée des sous-unités D et F qui entraîne à son tour, la rotation des sous-unités c et la sous-unité a [<sup>202</sup>; <sup>203</sup>].

### 4.3 XENOPHAGIE

L'induction de la xénophagie commence déjà à un niveau extracellulaire dès la détection des virus, bactéries ou autres microbes via les TLRs (**Figure 28**). Plus particulièrement TLR1, 2, 4 et 7 qui jouent un rôle bien décrit dans cette induction [<sup>204</sup>].

**Figure 28 : les récepteurs cellulaires inducteurs de la xénophagie**

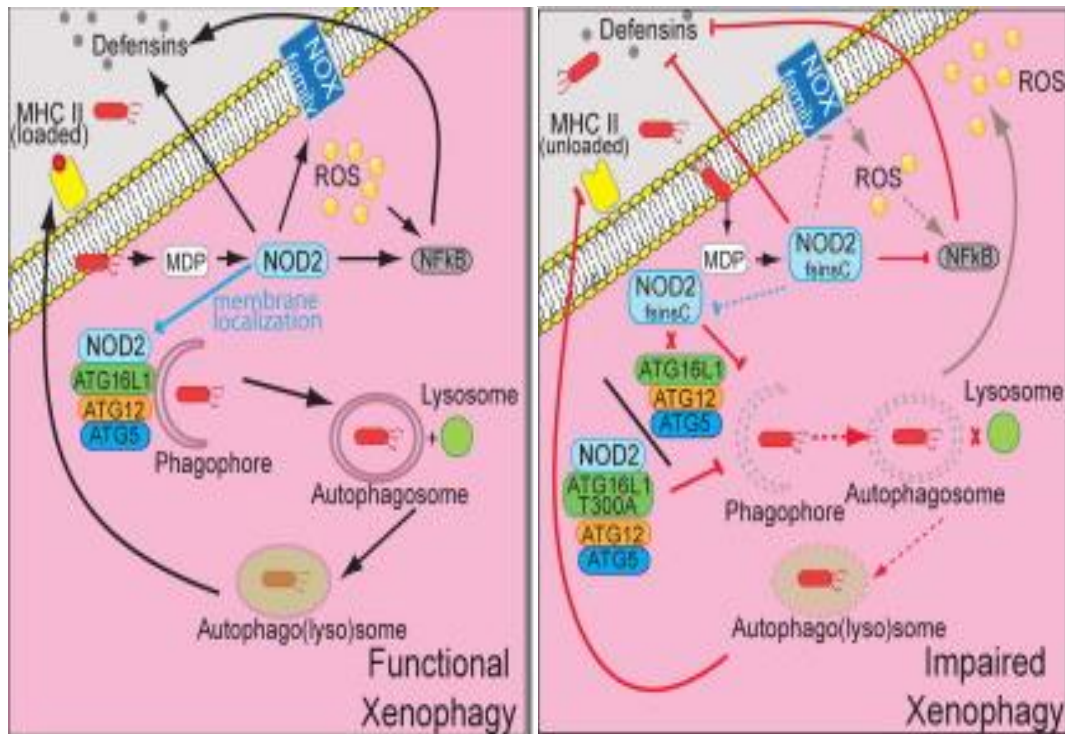


Au niveau intracellulaire, c'est le récepteur NOD2 qui recrute ATG16L1 au site d'entrée des bactéries, activant ainsi la machinerie autophagique. Une étude a démontré qu'un mutant NOD2 L1007fsinsC associé à MC est incapable d'activer la voie NFκB et de recruter la protéine ATG16L1. NOD2 affecte ainsi la réponse autophagique en réponse au MDP pour cibler les bactéries intracellulaires [<sup>44</sup>]. Par ailleurs, une autre étude faite par Kuballa et coll en 2008, a démontré qu'une mutation perte de fonction d'ATG16L1 induisait un défaut xénophagique. Des cellules épithéliales intestinales humaines exprimant le variant ATG16L1-T300A présentent un défaut de capture de *Salmonella typhimurium* dans les autophagosomes. L'hypothèse avancée est que la susceptibilité MC est due à un défaut de capture et de gestion des bactéries par la machinerie xénophagique (**Figure 29**) [<sup>206</sup>]. Ces résultats ont été corroborés par d'autres

études par la suite [207; 208; 71], excepté dans une publication de Fujita et coll en 2009, où les auteurs n'ont pas observé d'effet notable du variant T300A [209].

**Figure 29 : Influence des mutations associées à la MC sur le processus xénophagique**

[210]



L'invasion bactérienne induit la sécrétion immédiate de peptides antimicrobiens dans la lumière intestinale par les cellules de Paneth. Les macrophages réagissent par une réponse xénophagique efficace chez un individu contrôlé. La reconnaissance MDP/NOD2 induit une interaction NOD2/ATG16L1 au site d'entrée de la bactérie induisant le recrutement du complexe ATG16-ATG-ATG12 et la formation du phagophore. Les peptides relargués par les autophagolysosomes sont présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II. De plus, l'activation de NOD2 par le MDP bactérien entraîne une production de défensines NFKB dépendante et la génération de ROS (figure gauche). Le défaut xénophagique dû aux variants NOD2-L1007fsinsC et ATG16L1-T300A se traduit par un défaut de sécrétion des peptides antimicrobiens dans la lumière intestinale en réponse à l'infection bactérienne. NOD2-L1007fsinsC est incapable de guider ATG16L1 au site d'entrée des bactéries. Le variant ATG16L1-T300A est capable de recruter le complexe ATG12-ATG15 mais

*n'induit pas la xénophagie. Dans les deux cas les MHC de classe II ne présentent pas d'antigènes et la réponse immunitaire adaptative n'est pas efficace. De plus, la production de défensine est altérée et celle des ROS est perdue en réponse au MDP.*

#### 4.3.1 CIBLAGE XENOPHAGIQUE :

L'autophagie sélective repose sur une reconnaissance spécifique des cibles à dégrader et plusieurs des molécules permettant ce ciblage ont été caractérisées [211]. Au cœur de cette sélectivité, on retrouve la protéine LC3C (il y a deux autres formes de LC3 A, B seule cette dernière (LC3C) est qui joue un rôle déterminant dans la xénophagie [212]. C'est son domaine d'interaction LIR [213] qui interagit avec des autres partenaires autophagiques. Notamment, des protéines adaptateurs dont le récepteur p62, ou sequestosome1(SQSTM1), a été le premier identifié [214]. Komatsu a démontré en 2007, grâce à la délétion de p62 dans le foie de souris que cette protéine qui se lie à LC3 et à l'ubiquitine, régule l'agrégation des protéines et qu'elle est dégradée par l'autophagie. Il a aussi démontré que le blocage de l'autophagie induit un échec de dégradation de p62 et une accumulation des agrégats protéiques [215]. Des études qui mettaient en évidence l'ubiquitination de *Salmonella typhimurium* [216] et son adressage autophagique [217] a permis d'identifier p62 comme un récepteur xénophagique des bactéries cytosoliques [203].

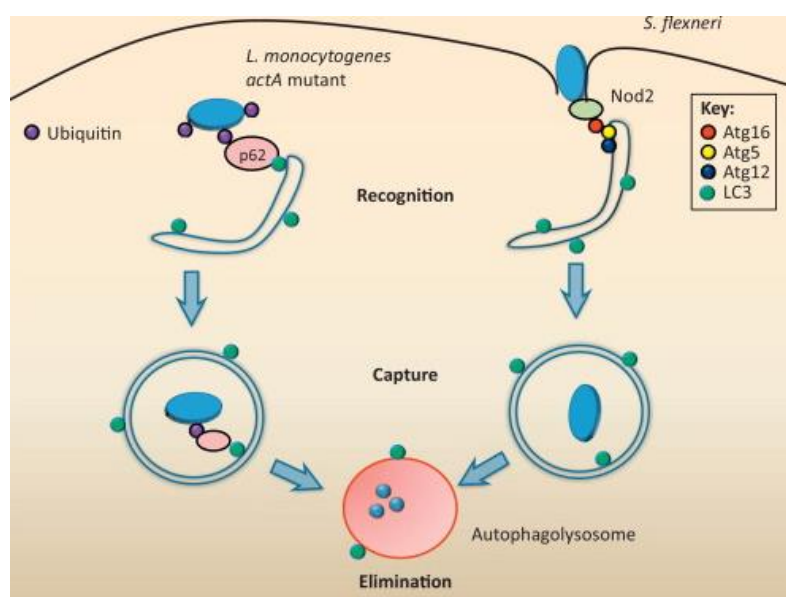
La prise en charge intracellulaire des bactéries se fait par liaison de p62 à une ubiquitine présente directement sur la bactérie ou sur l'enveloppe d'entrée de cette dernière [218]. Il existe néanmoins un mécanisme alternatif qui fait intervenir le récepteur NOD2 (**Figure 30**).

La voie ubiquitine-P62-LC3 est aussi impliquée dans le ciblage xénophagique du mutant  $\Delta actA$  de *Listeria monocytogenes* (qui n'exprime pas la protéine « actin-base motility surface protein » (ActA) indispensable à sa mobilité), mais pas dans celui de la souche sauvage de *Listeria monocytogenes* [216]. Ceci suggère que cette voie est un mécanisme général de reconnaissance de bactéries cytosoliques. Cependant, une autre voie d'adressage

xénophagique a été décrite. En réponse à une infection par *S. typhimurium* une voie d'adressage xénophagique utilise le diacylglycerol (DAG) généré par les « Salmonella containing vacuoles » (SCVs) endomagées [219].

D'autres récepteurs ayant le même rôle d'adressage que p62 ont été depuis identifiés comme NDP52 [220] et NBR1 [222] qui est permet de contrôler la réplication bactérienne dans le processus xénophagique et ce en synergie avec l'action de P62 [221].

**Figure 30 : Reconnaissance autophagique des bactéries**

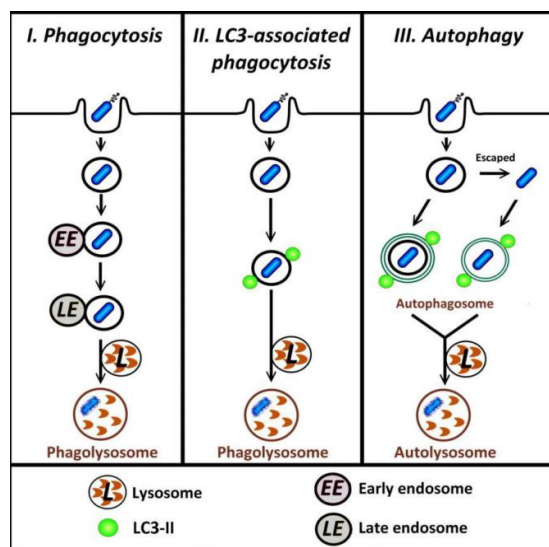


La prise en charge intracellulaire des bactéries par la xénophagie se fait en fonction du type d'entrée de ces dernières. *Listeria monocytogenes* est une souche gram positif mutante pour la protéine *actA* (*actA* qui lui permet de former une queue d'actine au niveau de son pôle et de se déplacer). Elle est cytosolique et ubiquitinée ce qui permet de recruter p62 qui lie LC3 présent sur la membrane de l'autophagosome en formation permettant ainsi la séquestration de la bactérie puis son élimination suite à la formation de l'autophagolysosomes. *Shigella flexneri* est reconnue immédiatement à la membrane lors de son entrée par Nod2. Nod2 recrute Atg16 au site d'entrée permettant son adressage à l'autophagosome en formation.

L'étude d'une relation potentielle entre infection et autophagie s'est récemment mis en place avec un intérêt particulier pour les mécanismes de reconnaissance bactérienne [207;218]. La machinerie de reconnaissance autophagique reconnaît la bactérie à l'entrée de la cellule qu'elle soit contenue dans un phagosome, ou libre dans le cytosol, ubiquitinée ou non ubiquitinée [223; 224] (**Figure 30**) et cette reconnaissance nécessite un recrutement de protéines à la membrane comme pour le processus de phagocytose. Ces études ont permis de mettre en évidence un nouveau rôle de LC3 indépendant de l'autophagie dans la « LC3-associated-phagocytosis » (LAP). Au cours de ce processus, LC3 est recruté directement à la membrane du phagosome contrairement au processus autophagique où il est incorporé à la membrane de l'autophagosome (**Figure 31**).

**Figure 31 : la LC3-associated-phagocytose, implication de LC3 indépendante de l'autophagie**

[225]



- I- la voie classique de phagocytose au cours de laquelle la maturation du phagosome contenant la bactérie internalisée se fait par fusion avec les endosomes jusqu'à sa liaison avec le lysosome entraînant la dégradation de la bactérie.*
- II- au cours de la LC3-associated-phagocytosis (LAP), des protéines autophagiques incluant LC3-II sont recrutées à la surface du phagosome qui fusionne avec un lysosome par la suite.*

*III- la voie classique de l'autophagie peut cibler des bactéries contenues dans un phagosome ou qui en échappe.*

#### 4.4 LES MECANISMES D'ECHAPPEMENT :

Les pathogènes incluant les bactéries possèdent des capacités remarquables d'adaptation à leur environnement. Ils ont développé des stratégies leur permettant non seulement d'échapper mais même de détourner les processus de défense cellulaire afin de persister dans la cellule et de se multiplier. Conformément à cela, certaines bactéries ont mis en place des mécanismes pour contrer le processus xénophagique.

##### 4.4.1 STRATÉGIES D'ÉVITEMENT :

Vu l'efficacité et la rapidité de l'adressage autophagique des microbes intracellulaires dès leur entrée dans la cellule, certaines bactéries ont développé une stratégie d'exclusion [226]. C'est le cas des bactéries *Shigella flexneri* et *Lysteria monocytogenes*. *S. flexneri* sécrète une protéine de virulence, IcsB, qui entre en compétition avec ATG5 pour sa liaison avec la protéine de virulence VirG présente à la membrane de la bactérie, liaison nécessaire à l'induction de la cascade autophagique [227]. Dans un système parallèle, *L. monocytogenes* utilise la protéine « actin-based motility surface protein » (ActA) pour éviter la dégradation xénophagique [216; 217]. Yoshikawa et coll ont démontré que la mobilité basée sur l'actine en elle-même n'est pas responsable de cet évitement mais qu'en revanche ActA induit le recrutement de composants du cytosquelette cellulaire de l'hôte qui empêchent la reconnaissance cytosolique de la bactérie. Il a été proposé que *L. monocytogenes* se déguise par l'initiation du processus de mobilité basée sur l'actine, bloquant ainsi sa reconnaissance par la voie ubiquitine-P62-LC3 [207].

Seuls les virus ont été décrits comme capables d'inhiber de façon directe l'induction du processus autophagique. L'« herpes simplex virus » (HSV-1) est l'exemple le plus démonstratif de cette capacité (**Figure 31**). D'autres bactéries envahissent les cellules et s'entourent d'une vacuole comme *Salmonella Typhimurium* et sa « Salmonella containing vacuole » (SCV) [228]. Sans oublier, *Mycobacterium tuberculosis* qui infecte les macrophages et sécrète la protéine « enhanced intracellular survival » (Eis) qui inhibe l'autophagy de manière non spécifique [229].

*Toxoplasma gondii*, *Chlamydia*, *F. tularensis* ont aussi développé chacune un moyen d'éviter le processus xénophagique [230].

#### 4.4.2 STRATEGIES DE DETOURNEMENT:

Ces stratégies sont encore plus élaborées que celles citées précédemment car elles impliquent un détournement des processus cellulaires d'élimination du pathogène, en faveur de sa survie et sa multiplication. La stratégie la plus utilisée par les microbes est celle de l'auto-séquestration dans des vésicules cellulaires afin d'exploiter des éléments nutritifs de la cellule hôte [231]. Ce mécanisme est bien décrit dans la littérature dans le cas des virus de la polio, du VIH, de l'hépatite C et aussi du poliovirus (**Figure 31**).

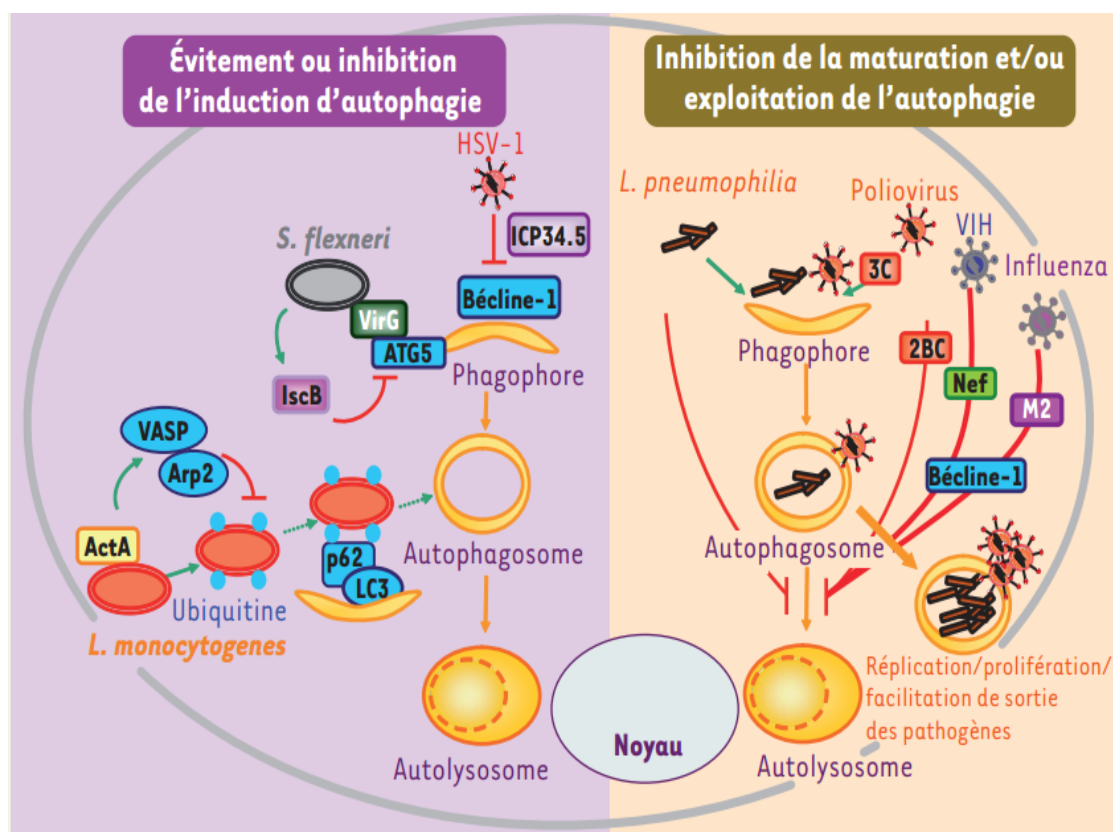
En ce qui concerne les bactéries, certaines sont capables d'une part de moduler le trafic intracellulaire de leurs vacuoles, dans le but de résider dans des vésicules de nature autophagique, et d'une autre part de bloquer leur fusion avec les lysosomes et éviter ainsi leur dégradation. Les exemples non exhaustifs qui illustrent ce phénomène sont ceux de *Yersinia pestis* [232] et *Yersinia paratuberculosis* [233] qui résident dans les autophagosomes des macrophages infectés en bloquant l'acidification des autophagosomes et empêchant ainsi leur dégradation.



Il y a aussi le cas de *Legionella pneumophila* qui retarde la maturation des autophagosomes ce qui lui donne le temps de s'adapter aux compartiments intracellulaires [234]. De même *Coxiella burnettii* est capable de se diviser dans une vacuole LC3 positive à pH acide, ce qui laisse à penser qu'elle utilise le processus autophagique pour générer cette vacuole [205]. Enfin, *L. monocytogenes* peut aussi être contenu dans les macrophages dans des vacuoles appelées « spacious Listeria-containing phagosomes » (SLAPs) dont la formation nécessite le processus autophagique [217]. La « pore-forming toxin Listeriolysin O » (LLO) (enzyme bactérienne qui clive la membrane des phagosomes) est nécessaire pour la formation des SLAPs car elle induit l'autophagie [235].

**Figure 32 : Manipulation microbiennes de l'autophagie**

[205]



Exemples de bactéries et virus ayant adopté une stratégie d'évitement ou d'exploitation du processus autophagique :

- *Shigella flexneri* sécrète l'effecteur IcsB qui lie la protéine IcsA exprimée à la membrane du phagophore ce qui empêche la liaison de Atg5 à IcsA et empêche son adressage aux autophagosomes. *Shigella* sécrète aussi la protéine VirA qui inactive la protéine Rab1 nécessaire à la formation de l'autophagosome.

- *Legionella pneumophila* sécrète la protéine effectrice RavZ qui clive de façon irréversible LC3-II de la membrane du phagophore empêchant ainsi la formation d'autophagosomes matures.

- L'« herpès simplex virus 1 » HSV-1 sécrète un facteur inhibiteur de Beclin 1 bloquant ainsi le processus autophagique à l'initiation.

D'une manière générale, les pathogènes sont restreints à des espaces prédéfinis au niveau de l'organisme hôte. La lumière de l'intestin constitue l'un de ces espaces restrictifs. Les MICI favorisent une rupture de cette restriction par les différentes altérations qu'elles induisent, entre autres, au niveau de la barrière intestinale. L'inflammation chronique caractéristique de ces pathologies est en partie liée aux microbes. Un défaut du processus autophagique a récemment été lié aux MICI (mutations IRGM, ATG16L1 ainsi que les gènes de susceptibilités NOD2). L'implication d'un facteur bactérien dans ces pathologies est fortement évoquée. La xénophagie est un processus dédié à la prise en charge de microbes intracellulaires dont les bactéries, une altération de ce processus chez les patients MICI pourrait aussi être envisagée.

## **OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE**

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier l'implication des AIEC dans la MC.

La première partie de cette étude vise d'une part à caractériser l'induction du facteur de transcription hypoxique, HIF-1, par les bactéries AIEC et d'autre part à étudier la conséquence de cette activation dans les cellules épithéliales.

- Quelles sont les réponses cellulaires activées par son induction?

- Cette induction est-elle au profit de l'hôte ou de la bactérie?

HIF-1 $\alpha$  est un inducteur de l'autophagie, des gènes impliqués dans ce processus sont mutés chez les patients MC et les AIEC survivent mieux dans des cellules dont l'autophagie est altérée. La deuxième partie de cette étude est focalisée sur le rôle que joue HIF-1 $\alpha$  dans le contrôle d'un processus cellulaire dédiée à l'élimination des bactéries intracellulaires.

- HIF-1 $\alpha$  controle-t-il la xénophagie?

## ***Résultats***

# RÉSULTATS

## INTRODUCTION PAPIER 1

Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle des bactéries dans la pathologie des MICI. A commencer par les études sur les modèles animaux d'inflammation intestinale dont les symptômes sont atténués lorsqu'ils sont élevés en conditions axéniques [53]. En passant par l'observation que les lésions MICI qui se développent au niveau des segments intestinaux où la densité bactérienne est la plus élevée [236]. Et enfin, compte tenu du grand nombre de gènes de susceptibilité MICI identifiés qui jouent un rôle dans la reconnaissance bactérienne (NOD, NLRP3 et autres PRRs) [53]. Les « Adherent-Invasive Escherichia coli » (AIEC) sont des bactéries gram négatives isolées à partir des lésions iléales de patients MC où elles ont une prévalence élevée comparée aux autres bactéries [237 ; 179 ; 238 ; 239 ; 240 ; 241 ; 242]. Les AIEC sont capables d'adhérer à la bordure en brosse des entérocytes et d'envahir les cellules épithéliales intestinales [167]. Des travaux antérieurs ont permis de décrire le mécanisme par lequel les AIEC se lient aux cellules épithéliales intestinales. Cette adhérence se fait via le facteur de pathogénicité pili de type 1 (adhésine majeure des souches AIEC) qui reconnaît le récepteur CEACAM6 ; ce dernier est surexprimé au niveau de l'iléon des patients MC [240]. La liaison pili-CEACAM6 se traduit par la stimulation de plusieurs médiateurs intracellulaires qui en retour induisent une surexpression de cytokines pro inflammatoires (IL-8, TNF $\alpha$ ) [240]. Parallèlement à l'inflammation, l'angiogenèse est un processus clairement lié à la pathogenèse des MICI [243]. L'angiogenèse est principalement contrôlée par le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  [244]. Il est particulièrement intéressant de noter que HIF-1 $\alpha$  est aussi connu pour stimuler la production de certaines cytokines inflammatoires. Parmi ces cytokines,

IL-8, reconnue pour sa capacité à attirer les neutrophiles au niveau des lésions inflammatoires, participe à la formation de nouveaux vaisseaux [<sup>133</sup>].

Comme je l'ai détaillé dans l'introduction de cette thèse, l'accumulation de HIF-1 $\alpha$  est conditionnée à plusieurs stimuli. Parmi ces stimuli on retrouve le LPS, un composant de la membrane des bactéries Gram négative, ainsi que certaines souches bactériennes [<sup>134</sup>]

D'une part, nous savions que les AIEC participent à la pathogenèse des MICI, d'autre part l'angiogenèse avait été décrite comme une étape importante de la progression de ces pathologies inflammatoires du tube digestif ; néanmoins aucune étude n'avait exploré le potentiel pro angiogénique des AIEC et décortiqué les mécanismes moléculaires associé à cette réponse.

L'objectif de cette première partie de mon travail de thèse a été de combler ce manque.

Ce travail, publié dans la revue Gut microbes en 2011, met en évidence le potentiel des AIEC à induire une réaction pro angiogénique et pro inflammatoire via l'accumulation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ . Ces résultats ont été observés sur un modèle murin qui répond à une infection par les AIEC LF82 (souris CEABAC10) et sur un modèle de cellules épithéliales intestinales en culture, les cellules T84. De plus, nous avons montré chez l'homme que HIF-1 $\alpha$  est sur exprimé sur la muqueuse iléale de patients MC en phase active d'inflammation.

# Crohn disease-associated *Escherichia coli* promote gastrointestinal inflammatory disorders by activation of HIF-dependent responses

Sanda Mimouna,<sup>1,2,†</sup> Diogo Gonçalves,<sup>1,2,†</sup> Nicolas Barnich,<sup>3,4,†</sup> Arlette Darfeuille-Michaud,<sup>3,4</sup> Paul Hofman<sup>1,2,5</sup> and Valérie Vouret-Craviari<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM ERI-21/EA4319; Nice, France; <sup>2</sup>University of Nice-Sophia Antipolis; Nice, France; <sup>3</sup>Clermont Universités, Université d'Auvergne; Clermont-Ferrand, France; <sup>4</sup>INRA USC 2018; Clermont-Ferrand, France; <sup>5</sup>Laboratory of Clinical and Experimental Pathology and Human Biobank; Pasteur Hospital; Nice, France

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**Keywords:** Crohn disease pathogenesis, adherent-invasive *Escherichia coli*, hypoxia-inducible factor, angiogenesis

Crohn disease (CD) ileal lesions are colonized by adherent-invasive *E. coli* (AIEC) that locally induce inflammation. Hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  protein is expressed in acute and chronically inflamed site; however the molecular basis of this expression is not fully understood. The aim of the study was to access whether AIEC induce HIF-1 $\alpha$  expression and to study the consequence of HIF-1 $\alpha$  expression on the onset of Crohn disease pathogenesis. We show that HIF-1 $\alpha$  is maximally expressed in inflamed ileal epithelium of CD-patients. CEACAM6, a protein that acts as a receptor of AIEC, is expressed in this particular condition. Using CEABAC 10 transgenic mice that express CEACAM6, we show that AIEC bacteria, but not non-pathogenic *E. coli* K12, induce the production of HIF-1 $\alpha$  protein and the activation of VEGF/VEGFR signaling. Downstream analyses on human intestinal epithelial cells silenced for *hif-1 $\alpha$* , highlight the crucial role of this protein in production of pro-angiogenic factors. This study highlights the crucial role of AIEC bacteria as promoter of inflammatory disorders of the gastrointestinal tract and provides clear evidence that HIF-1 $\alpha$  protein plays a major role in mediating this effect.

## Introduction

Mainly located in the gut, the microbiota is crucial to human life by influencing human physiology and nutrition.<sup>1</sup> In addition, it contributes to the shaping of healthy intestinal immune response.<sup>2</sup> Inflammatory bowel diseases (IBD) are human inflammatory disorders including Crohn disease (CD) and ulcerative colitis (UC) which represent a major public health problem. However, the etiology of IBD remains poorly understood and various genetic, environmental and infectious factors have been proposed.<sup>3</sup>

Independent studies have reported the abnormal presence of intramucosal *Escherichia coli* or mucosa-associated *E. coli* with invasive properties in patients with CD or colorectal cancer.<sup>3–5</sup> In particular, it was demonstrated that adherent-invasive *E. coli* (AIEC) isolated from the ileal mucosa of CD-patients induce expression of pro inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-17), decrease expression of anti-inflammatory cytokine (IL-10) and aggravate colitis in injured mouse colon. These cellular responses are mediated by type 1 pili expressed by AIEC bacteria which bound CEACAM6 receptor,<sup>6,7</sup> protein overexpressed in 35% of CD patients having ileal involvement.<sup>8</sup>

The Hypoxia-Inducible Factor (HIF-1), which orchestrates cellular metabolism and cellular adaptation to oxygen privation (hypoxia), is induced by growth factors or LPS challenge<sup>9</sup> and is known to regulate the angiogenic response.<sup>10</sup> Angiogenesis, which corresponds to the growth of new blood vessels in adults, occurs in physiological or in pathological situations. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin 8 (IL-8) act as the major mediators of angiogenesis.<sup>11,12</sup> Interestingly, VEGF levels and angiogenesis are increased in IBD and correlate with disease activity.<sup>13</sup>

Since (1) increase in HIF-1 $\alpha$  protein level induces VEGF production, (2) VEGF links angiogenesis to inflammation in IBD onset<sup>14</sup> and (3) AIEC induce gut inflammation, we wonder whether AIEC were able to stabilize HIF-1 $\alpha$  and trigger production of angiogenic factors. Our studies demonstrated that the ileum and colon of patients with CD contain high levels of the HIF1 $\alpha$  protein, particularly in inflamed ileum, a tissue known to abnormally express CEACAM6 receptor. Further, CD-associated AIEC bacteria induce the production of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in both human intestinal epithelial cells (IEC) and transgenic mice model expressing human CEACAM6 (IEC). Interestingly, we demonstrated in human T84-IEC challenged with AIEC LF82

\*Correspondence to: Valérie Vouret-Craviari; Email: vouret@unice.fr  
Submitted: ; Revised: ; Accepted:  
<http://dx.doi.org/10.4161/gmic.2.6.18771>

bacteria that HIF-1, via activation of the classical NF $\kappa$ B-associated pathway, triggers pro-angiogenic factor secretion.

## Results

### Inflamed ileum of CD-patients abnormally expressed HIF-1 $\alpha$ .

An increase in the level of the HIF-1 $\alpha$  protein in IBD patients was previously reported,<sup>15-17</sup> but the number of patients included in this previous study was low and the tissue location (ileum or colon) was not documented. Here we examined the presence of HIF-1 $\alpha$  in ileal and colon biopsies of a large cohort of 180 CD-patients in acute and quiescent phases of the disease. As shown in **Figure 1A**, acute inflamed ileal and colon biopsies of CD-patients showed loss of glandular structures accompanied by strong inflammatory infiltrate whereas biopsies from quiescent patients retained glandular structures surrounded by inflammatory cells. Immunohistochemistry against HIF-1 $\alpha$  using tissue micro arrays (TMA) revealed numerous stained nuclei, from the bottom of the crypts to the apical surface of villi, in the epithelia of the ileum and colon of CD-patients. In the acute phase of the disease, HIF-1 $\alpha$  staining was observed in 86% of ileal biopsies and in 82% of colon biopsies. In the quiescent phase, fewer CD-patients expressed HIF-1 $\alpha$  with 37% in ileal biopsies and 34% in colon biopsies whereas in healthy individuals staining was detected in 21% and 18% of biopsies from ileon and colon respectively. Quantification of immunostaining approach showed that the positive cell density for ileal biopsies of patients presenting an acute phase of CD was significantly higher (4-fold increase) than that observed in a quiescent phase of CD and in control healthy subjects (**Fig. 1B**). In colon biopsies, we observed a 3-fold increase in the number of positive epithelial cells from patients presenting either an acute (inflamed) or a quiescent (less-inflamed) phase of CD. In contrast, a few positive epithelial cells were observed in colon biopsies of control healthy subjects. In conclusion, intestinal biopsies of CD-patients are positive for HIF-1 $\alpha$  staining. Our studies highlight a difference in HIF-1 $\alpha$  expression between ileum and colon. Indeed, HIF-1 $\alpha$  expression is more intense in inflamed ileum (160 positive HIF-1 $\alpha$  cells per mm<sup>2</sup>) than in inflamed colon (110 cells per mm<sup>2</sup>) or healthy individuals (cell density  $\leq$  40). Interestingly, we previously published that inflamed ileum overexpresses CEACAM6 protein and is colonized by AIEC.<sup>8,18</sup>

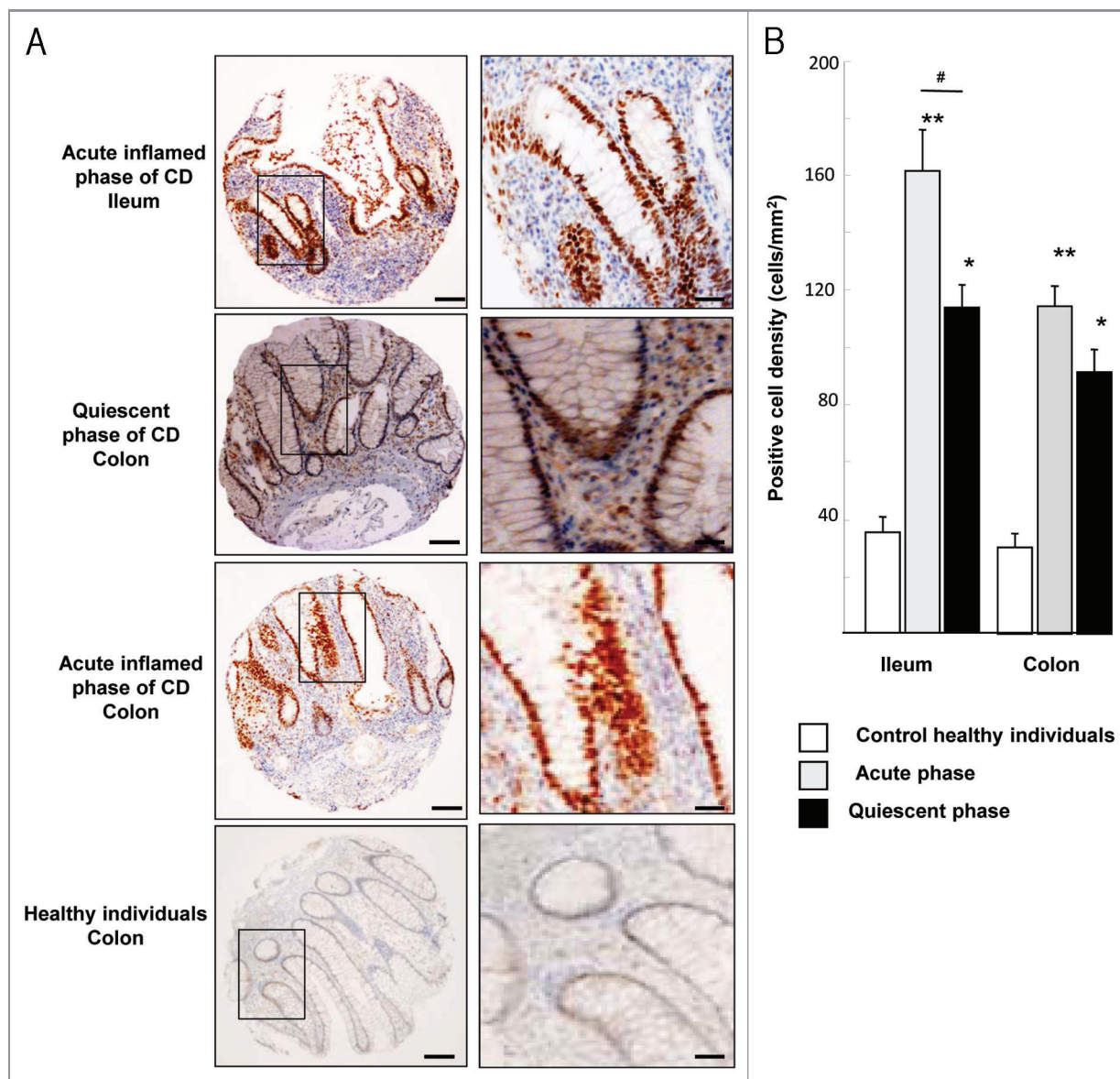
**CD-associated AIEC LF82 bacteria increase HIF-1 $\alpha$  protein levels in a CEABAC 10 mice model.** Intestinal biopsies of CD-patients expressed HIF-1 $\alpha$  and we previously published that CD-associated AIEC LF82 bacteria are able to persist in the gut of CEABAC 10 transgenic mice that express human CEACAM6 protein and to induce severe colitis.<sup>6</sup> Since HIF-1 $\alpha$  played a role in murine experimental colitis,<sup>19</sup> we investigated whether AIEC LF82 bacteria can induce HIF-1 $\alpha$  stability in the intestinal mucosa of CEABAC 10 mice. Mice were orally challenged with 10<sup>9</sup> AIEC LF82 bacteria or non-pathogenic *E. coli* K12 bacteria. At 7 d post-infection, AIEC-LF82 bacteria were detected using anti-O83 antibody (directed against LPS O-core to detect AIEC strain LF82) in colon of CEABAC 10 mice, but not in the colon of AIEC infected-WT mice (**Fig. S1**). An increased level of

HIF-1 $\alpha$  mRNAs was observed in colonic tissue biopsies of CEABAC 10 mice infected with AIEC LF82 bacteria compared with that of non-infected CEABAC 10 mice or CEABAC 10 mice infected with non-pathogenic *E. coli* K12 (**Fig. 2A**). At the protein level, we observed faint HIF-1 $\alpha$  staining in the cytoplasm of mature enterocytes located on the luminal side of the crypts whereas cells located at the basal side were negative (**Fig. 2B**). As described previously for CEABAC 10 mice, non-pathogenic *E. coli* K12 did not affect tissue organization and we reported here that HIF-1 $\alpha$  staining is similar to that observed in non-infected CEABAC 10 mice. In contrast, AIEC LF82 bacteria infection in CEABAC 10 transgenic mice led to disappearance of glandular structures that correlate with an important inflammatory infiltrate and an increase in the number of HIF-1 $\alpha$  positive cells. Staining within epithelial cells was nuclear and cytoplasmic; this cytoplasmic staining is specific, since it was not present when tissue sections were stained with a control antibody. Most of the immune cells were also positive for HIF-1 $\alpha$  staining. In conclusion, AIEC LF82 infection induces HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein expression in transgenic CEABAC 10 mice mimicking ileal CD susceptibility.

**The VEGF pathway is induced by AIEC LF82 infection in CEABAC 10 mice.** Since VEGF is a major factor in IBD pathogenesis,<sup>14</sup> we determined whether AIEC bacteria lead to production of angiogenic factor. To investigate this hypothesis, mucosal expression of VEGF was analyzed in CEABAC 10 mice challenged with AIEC LF82 bacteria. Immunohistochemistry revealed that VEGF was expressed at a low level and only located in the cytoplasm of mature enterocytes at the luminal side of the crypts in non-infected CEABAC 10 transgenic mice (**Fig. 3A**). No increase in VEGF staining was observed in transgenic mice infected with the non-pathogenic *E. coli* K12 or in WT mice infected with AIEC LF82. In contrast, strong cytoplasmic staining in mature enterocytes but also in less mature epithelial cells located from the base to the luminal side of crypts were observed (**Fig. 3A**). Moreover, in AIEC LF82 infected-CEABAC 10 mice the number of vessels was increased and endothelial cells that form vessels were stained with VEGF antibody. Finally, strong cytoplasmic staining in cells located within the lamina propria in areas of erosion was observed (**Fig. S2**). Next, we investigated the expression of VEGFR-2, the inducible form of VEGF receptor. VEGFR-2 was expressed at a very low level in mature enterocytes of non-infected CEABAC 10 mice (**Fig. 3B**). As described for VEGF, its expression was not modulated in WT mice following either non-pathogenic K12 bacteria or by AIEC LF82 infection. However, AIEC LF82 infection in CEABAC 10 mice led to an upregulation of VEGFR-2 expression in epithelial cells located along the entire crypt and also in a few cells within the lamina propria (**Fig. S2**). Further, the production of VEGF was quantified. An 1.81-fold increase of VEGF was measured in colonic biopsies of AIEC LF82 infected-CEABAC 10 mice compared with those of WT mice (**Fig. 3C**). Taken together, these data indicate that AIEC infection triggers production of VEGF.

**Production of angiogenic factors in response to AIEC LF82 bacteria depends on HIF-1 $\alpha$  in intestinal epithelial cells.** We



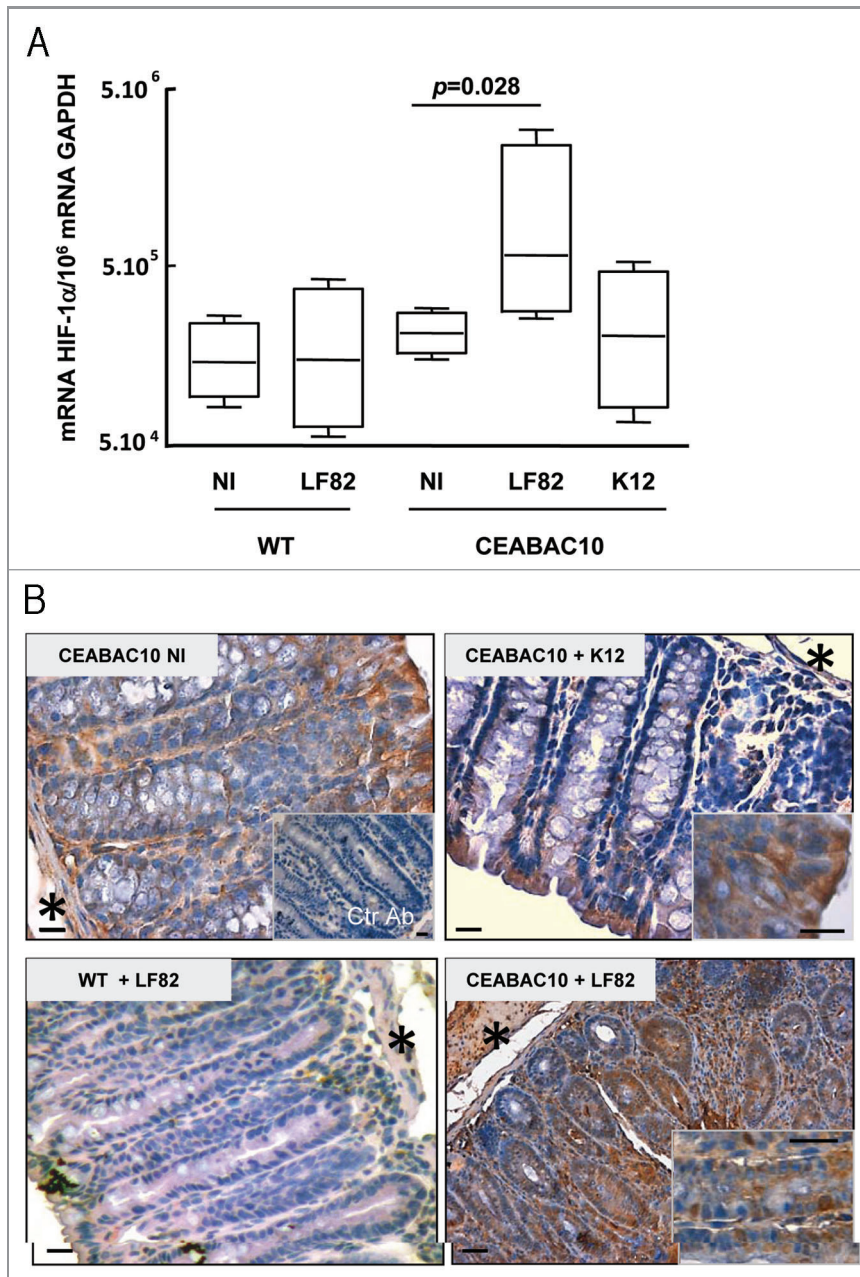


**Figure 1.** HIF-1 $\alpha$  staining in intestinal biopsies of CD patients and healthy subjects. (A) Immunohistochemical (IHC) staining of tissues micro-array (TMA) from ileal and colonic biopsies of patients in acute inflamed and quiescent phase of CD. Each picture is representative of immunostaining for HIF-1 $\alpha$  at low magnification (scale bar = 100  $\mu$ m) and at high original magnification scale bar = 30  $\mu$ m). IHC shows numerous HIF-1 $\alpha$ -stained nuclei, from the bottom of the crypts to the apical surface of villi, in the epithelia of the ileum and colon of CD-patients. (B) Quantification using the Spot Browser software of HIF-1 $\alpha$  immunostaining on TMA from colonic and ileal biopsies of 85 patients in the acute phase of CD, 95 patients in the quiescent phase of CD, and 48 control subjects \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  CD patients vs. healthy subjects; #  $p < 0.01$ , ileum of acute inflamed phase vs. quiescent phase of CD patients. TMA quantification shows that HIF-1 $\alpha$  positive cell density was increased in ileum and colon of CD-patients vs. control healthy individuals.

investigated the involvement of HIF-1 $\alpha$  in VEGF production. For that purpose, we confirmed that AIEC LF82 infection led to an increase in the relative amount of HIF-1 $\alpha$  protein in IEC. The amount of HIF-1 $\alpha$  increased in AIEC LF82-infected T84 cells from a multiplicity of infection (MOI) of 10 (Fig. 4A, left panel). To ensure that bacteria-induced HIF-1 $\alpha$  expression and stability was not a general consequence of bacterial growth in close proximity to cells, T84 cells were infected with the 291071 clone of commensal *E. coli*. Whereas commensal bacteria induced only a slight increase in HIF-1 $\alpha$  (Fig. 4A, right panel), AIEC LF82

infection systematically gave higher levels. In addition, no change in oxygen concentration in cells infected with either AIEC LF82 or a non-adherent mutant was detected (Fig. S3A) and protein synthesis inhibitor led to a blockage of the HIF-1 $\alpha$  increase in T84 cells (Fig. S3B). Taken together these results suggest that AIEC-induced HIF-1 $\alpha$  protein levels in independent of hypoxia.

Since one of the consequence of an increase in the HIF-1 $\alpha$  protein is the induction of angiogenic responses and because AIEC-infected CEABAC 10 transgenic mice presented an increase of HIF-1 $\alpha$  protein expression and VEGF expression,



**Figure 2.** AIEC LF82 bacteria increase HIF-1 $\alpha$  expression in CEABAC 10 transgenic mice. (A) Quantification of the HIF-1 $\alpha$  mRNA level was measured by RT-PCR in colonic biopsies of WT and CEABAC 10 mice non-infected (NI) or infected with AIEC LF82 or non-pathogenic *E. coli* K12 bacteria. HIF-1 $\alpha$  mRNA level is only increased in colonic biopsies of CEABAC 10 mice infected with LF82 bacteria. Results shown are representative of two separate experiments (n = 7 mice per group). (B) Representative brown immunohistochemical staining for HIF-1 $\alpha$  in sections of the colonic mucosa from WT or CEABAC 10 mice non-infected or infected with the non-pathogenic *E. coli* K12 or AIEC LF82 bacteria (scale bar = 20  $\mu$ m). Inset in panel CEABAC 10 NI shows the absence of staining when biopsy is stained with control isotypic antibody. Inset in CEABAC 10 K12 panel shows HIF-1 $\alpha$  cytoplasmic staining in mature enterocytes. Inset in CEABAC 10 LF82 panel highlights the HIF-1 $\alpha$  nuclear staining within epithelial cells located along the crypts. \*, muscularis mucosa

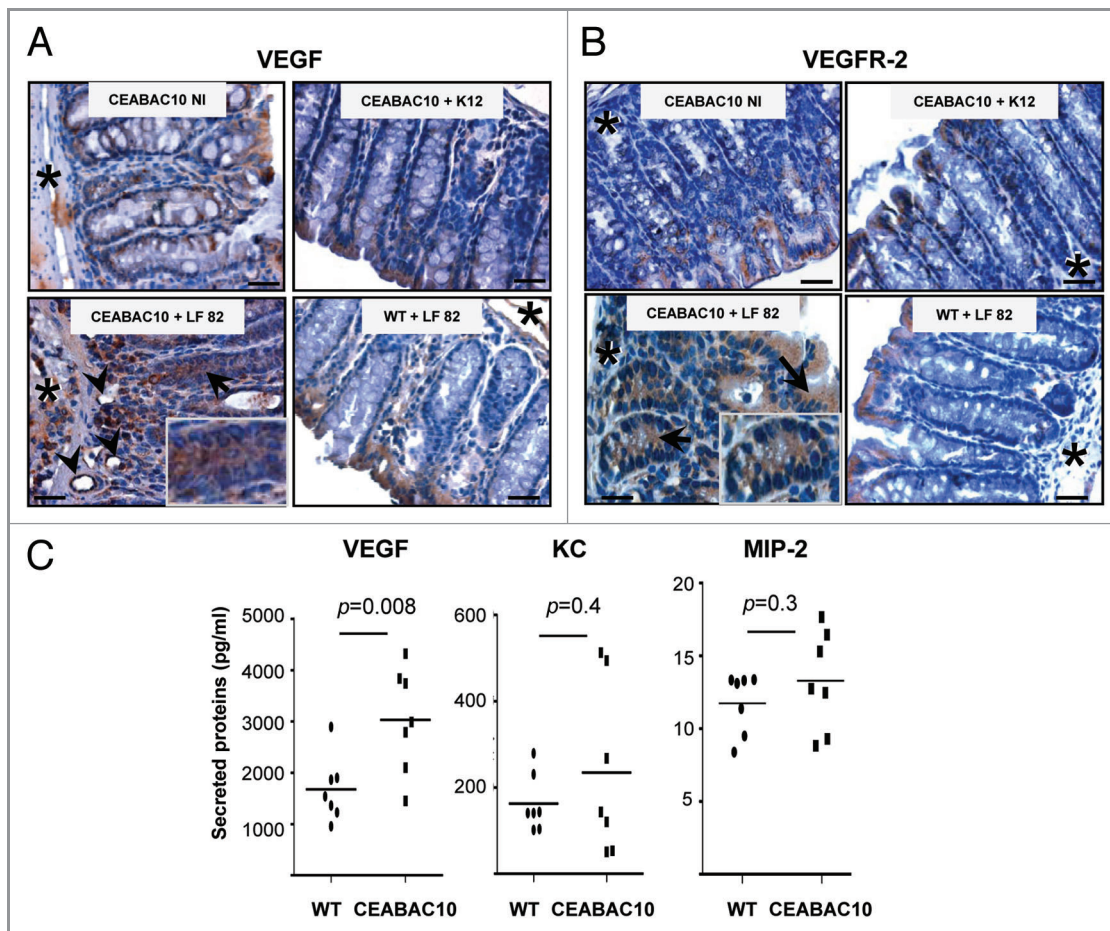
we investigated whether AIEC LF82 bacteria induced VEGF production in human T84 IEC. The conditioned medium of T84 cells infected for a 2h period with LF82 bacteria contained up to

80 pg/ml of VEGF (Fig. 4B). In contrast, the amount of VEGF produced by cells infected with the commensal 291071 *E. coli* clone is not different than that produced by non-infected T84 cells. In addition to VEGF, interleukin-8 (IL-8), cytokine associated with the promotion of neutrophil chemotaxis and degranulation, is also able to enhance angiogenesis.<sup>12</sup> We observed that both IL-8 mRNA and protein were upregulated in AIEC-LF82 infected T84 cells (Fig. 4B). Interestingly, AIEC LF82-induced VEGF and IL-8 mRNA and proteins expression were significantly reduced in *hif*-1 $\alpha$ -silenced T84 cells (T84-Sh*hif*-1 $\alpha$ ) compared with wild-type T84 (Fig. 4B, gray bars), whereas transfection with scramble siRNA or shRNA have no effect on VEGF and IL-8 production (data not shown). These results demonstrated the key role played by HIF-1 on the production of angiogenic factors in response to AIEC infection.

**AIEC-induced production of angiogenic factors involves NF $\kappa$ B pathway.** Recent studies highlighted an interdependent role for hypoxia-inducible factors and nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) in hypoxic inflammation.<sup>20</sup> Therefore, we analyzed the level of HIF-1 $\alpha$  protein expression and the phosphorylation state of I $\kappa$ B (a key signature of NF $\kappa$ B signaling pathway activation) in response to bacterial infection. First, the impact of NF $\kappa$ B inhibition on HIF-1 $\alpha$  expression in T84 cells was evaluated. For that purpose, cells were pre-treated with SC-514, a chemical inhibitor which blunts IKK-2 kinase activity. In that condition, inhibition of IKK-2 led to a 65% decreased in HIF-1 $\alpha$  protein levels (Fig. 5A). Further, the effect of HIF-1 on NF $\kappa$ B signaling was characterized. In cells depleted for HIF-1 $\alpha$  expression, no phosphorylation of I $\kappa$ B was detected (Fig. 5B). As control, the activation status of the NF $\kappa$ B signaling pathway in wild-type and HIF-1 $\alpha$  silenced T84-IEC was checked by stimulating cells with Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). In both cell types (T84 and T84-Sh*hif*-1 $\alpha$ ), TNF $\alpha$  induced phospho-I $\kappa$ B protein accumulation. In contrast, no HIF-1 $\alpha$  expression was detected in T84 cells treated with TNF $\alpha$ . Together, these results highlight a complex interconnection between HIF-1 and NF $\kappa$ B signaling.

**AIEC type 1 pili-mediated adhesion enhances TLR5 signaling.** AIEC LF82 pathogenicity is due to expression of type 1 pili and flagellin that respectively bind to CEACAM6 and TLR5 receptors.<sup>6,7</sup> However their respective roles in induction of signaling pathways are not



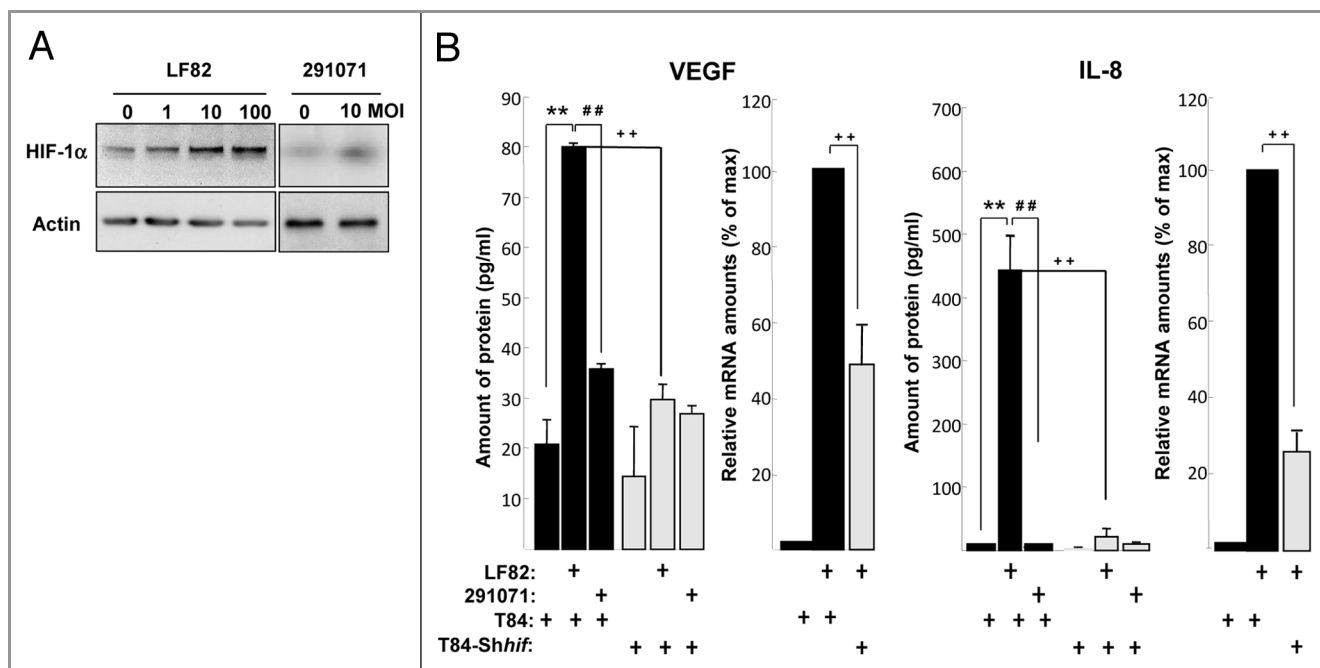


**Figure 3.** AIEC LF82 bacteria induce production of VEGF in CEABAC 10 transgenic mice. Representative brown immunohistochemical staining for VEGF (A) and VEGFR-2 (B) in sections of the colonic mucosa from non-infected (NI) CEABAC 10 mice, or AIEC LF82- or non-pathogenic *E. coli* K12-infected CEABAC 10 and WT mice; (scale bar = 10  $\mu$ m). Insets show cytoplasmic staining of VEGF (A) and VEGFR-2 (B) in epithelial cells located within crypts of CEABAC 10 mice infected with LF82 bacteria. Arrows point to cytoplasmic staining within epithelial cells and arrowheads indicate endothelial cell staining. \*, muscularis mucosa. (C) Secretion of VEGF, KC and MIP-2 was measured in colon supernatants from AIEC LF82-infected WT (n = 7) or CEABAC 10 (n = 7) mice. An increase in secreted VEGF concentration in CEABAC 10 mice infected with LF82 bacteria was measured by ELISA. Results shown here are representative of two separate experiments.

fully resolved. To investigate the role of type 1 pili in AIEC-induced production of VEGF and IL-8, cells were treated with D-mannose, a sugar described as strong inhibitor of type 1-mediated adhesion<sup>21</sup> (and Table S1). In this condition, the expression of both VEGF and IL-8 mRNA was impaired after AIEC infection (Fig. 6A, gray bars), demonstrating that adhesion mediated by type 1 pili is needed for the angiogenic factors production. When cells were infected with AIEC LF82- $\Delta$ *fimH* isogenic mutant (unable to produce type 1 pili but still expressing flagella), the relative amount of VEGF and IL-8 angiogenic factors is decreased, reaching 18% and 40% respectively of those produced in response to WT bacteria (Fig. 6B). Trans-complementation of AIEC LF82- $\Delta$ *fimH* isogenic mutant with *fimH* cloned gene resulted in restoration of VEGF and IL-8 production. Following infection with AIEC LF82- $\Delta$ *fliC* mutant that do not expressed flagella and type 1 pili,<sup>22</sup> VEGF production was decreased to the basal level and transformation of AIEC LF82- $\Delta$ *fliC* mutant with cloned *fliC* operon pPB104 restored cellular responses. Finally, cytochalasin D, that inhibits 80% of

cellular bacterial invasiveness (Table 1), has no significant effect on VEGF and IL-8 production (Fig. 5C). Therefore, we conclude that induction of cell signaling depends on bacterial adhesion to extracellular proteins.

Flagella, acting via TLR5, lead to pro-inflammatory gene program activation in epithelial cells.<sup>23</sup> However involvement of TLR5 in AIEC-induced cellular responses is not fully resolved. To study the involvement of TLR5 in VEGF and IL-8 production, we blocked its activation by pre-treating T84-IEC with an anti-TLR5 antibody. This led to a decrease in the relative amount of VEGF and IL-8 mRNAs level (Fig. 7A). TLR5-induced signaling pathways were described to activate transcription factors, such as NF $\kappa$ B and interferon regulatory factors, which in turn lead to induction of immune and inflammatory genes.<sup>24</sup> Because VEGF production is mainly known to be activated by the Ras > Raf > MEK > Erk as well as the PI3-kinase/Akt pathways,<sup>25</sup> the contribution of each signaling pathways was investigated in IEC. Immunoblot analysis were performed on total cell extracts and phosphorylations of the ERKs (ERK-1, ERK-2), AKT and I $\kappa$ B



**Figure 4.** AIEC LF82-induced VEGF and IL-8 production require HIF-1 $\alpha$  expression and NF $\kappa$ B signaling in human T84-IEC. (A) T84 cells were infected with increasing amounts of AIEC LF82 bacteria (from MOI of 1 to 100) or control commensal bacteria (clone 291071) for 2h. The HIF-1 $\alpha$  protein was assayed by immunoblotting using an anti-HIF-1 $\alpha$  antibody and the total actin level was monitored as a control for equal protein loading. We observed an increase in HIF-1 $\alpha$  protein levels in cells infected with LF82 bacteria. (B) VEGF and IL-8 secretion by T84 and T84-Shhif-1 $\alpha$  cells infected with AIEC LF82 or control commensal (clone 291071) bacteria was measured by ELISA as indicated in Materials and Methods. Data are expressed as the mean concentration of secreted proteins per  $8 \times 10^6$  cells for 4h  $\pm$  s.e.m. (n = 3). VEGF and IL-8 mRNA level from T84 and T84-Shhif-1 $\alpha$  cells infected with AIEC LF82 (MOI = 10) were quantified by qPCR. Data are expressed as the mean of the relative amount of mRNA expressed per  $8 \times 10^6$  cells  $\pm$  s.e.m. (n = 4). \*\*p < 0.01 relative to values of non-infected T84 cells. #p < 0.01 relative to values of LF82-infected vs. commensal (clone 291071)-infected T84 cells. ++p < 0.01 relative to values of LF82-infected T84 cells vs. LF82-T84 depleted for hif-1 $\alpha$  expression (T84-Shhif-1 $\alpha$ ) cells. LF82 bacteria induced production of VEGF and IL-8 is dependent on HIF-1 $\alpha$ .

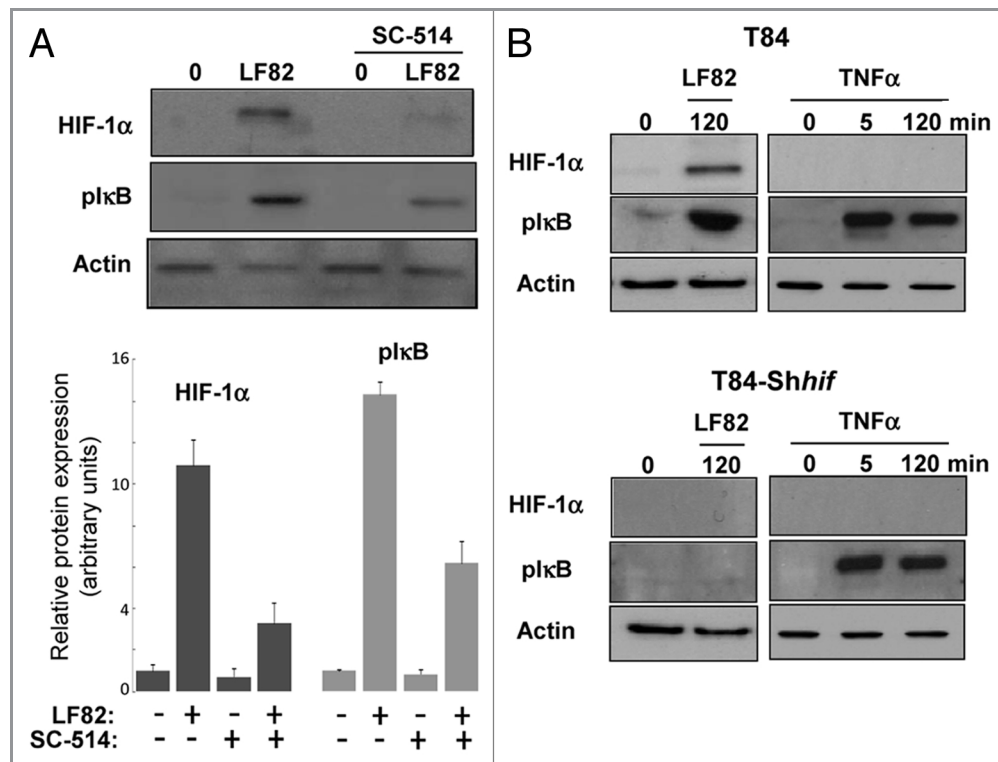
proteins were investigated, since phosphorylation of these proteins is a read out of MAP-kinases, PI-3K and NF $\kappa$ B signaling pathway activation respectively. Bands corresponding to phospho-ERKs, -AKT and -I $\kappa$ B appeared in a time dependent manner, with a maximum observed after 3h of AIEC infection (Fig. 7B). In addition, these signaling pathways were barely activated in response to commensal *E. coli* or AIEC LF82- $\Delta$ *fliC* isogenic mutant. Finally, IEC were pre-treated with selective inhibitors of MEK (PD184352), PI-3K (Ly294002) and IKK-2 (SC-514), prior AIEC LF82 or commensal bacterial infection and VEGF and IL-8 production was measured by quantitative RT-PCR. Whereas MEK and NF $\kappa$ B inhibitors significantly inhibited the increase in VEGF mRNA level, only the NF $\kappa$ B signaling pathway is involved in increase in IL-8 mRNA level (Fig. 7C). Together our results demonstrate that AIEC LF82 bacteria via TLR5 induce HIF-1 $\alpha$ , VEGF and IL-8 production. In human IEC, the increase in pro-angiogenic factors is dependent on the expression of bacteria-induced HIF-1 $\alpha$ , which cooperates with the NF $\kappa$ B-dependent signaling pathways.

## Discussion

It is now well admitted that intestinal inflammation arises from abnormal host-microbiota interactions. Indeed, dysbiosis toward

selected microorganisms and decreased complexity of commensal bacteria have been observed in patients with Crohn disease; however search for a single pathogen that induces CD was not successful. Therefore it is likely that CD-associated bacteria act in association with hosts' immune defects and/or mucosal barrier dysfunctions. Since (1) the interaction between AIEC and epithelial cells induces an upregulation of IL-8 expression, a marker of inflammation,<sup>26</sup> and (2) an increase in HIF-1 $\alpha$  protein levels is observed under inflammatory conditions, we wondered whether AIEC might induce HIF-1 $\alpha$  expression and what could be its consequence on CD pathogenesis. We demonstrated in this study that CD-associated AIEC bacteria induce the production of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and IL-8 in human IEC. Further, we showed that bacteria induce the production of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in a transgenic mice model. Then, we deciphered on a cell line model the mechanisms leading to HIF-1 $\alpha$  production and the role of HIF-1 in AIEC LF82-induced production of VEGF and IL-8. Finally we showed that HIF-1 acts in combination with the classical NF $\kappa$ B-associated pathway to trigger the secretion of pro-angiogenic factors (Fig. 8).

CEACAM-6 and TLR5 have been respectively involved in AIEC type 1 pili and flagella binding. Using mutants unable to produce either type 1 pili (AIEC LF82- $\Delta$ *fimH*) or both pili and flagella (AIEC LF82- $\Delta$ *fliC*) we confirmed the existence of a



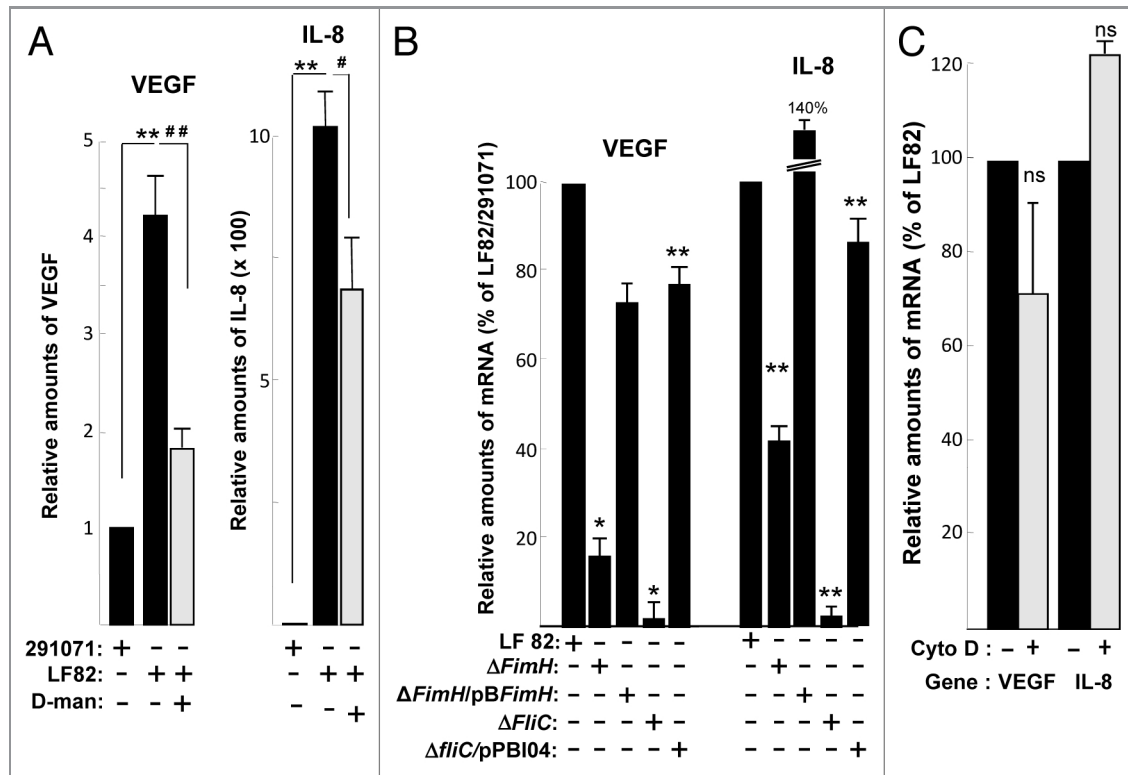
**Figure 5.** HIF-1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B signalings are interconnected. (A) protein gel blot analysis (upper panel) showed the effect of IKK-2 inhibitor (SC-514, 100  $\mu$ M) added one hour prior the infection with AIEC LF82 (MOI of 10) on HIF-1 $\alpha$  protein level. Quantification of immunoblot, using ImageJ software, (lower panel) demonstrated that blocking IKK-2 kinase activity results in a partial inhibition of HIF-1 $\alpha$  protein expression. Data are expressed as the mean of amount of protein expression  $\pm$  s.e.m. (n = 3). (B) Immunoblot showing HIF-1 $\alpha$  and phosphorylation of I $\kappa$ B in T84 and T84-Shhif-1 $\alpha$  cells infected for a 2 h period with AIEC LF82 bacteria (MOI = 10) or treated with TNF $\alpha$  for 45 and 120 min. The total actin level was monitored as a control for equal protein loading. This result highlights the ability of LF82 bacteria to induce phosphorylation of I $\kappa$ B in a HIF-1 $\alpha$  dependent manner.

cooperative interaction between pili and flagella in mediating AIEC-induced cellular responses. Indeed, AIEC LF- $\Delta$ *fimH* is more potent than AIEC LF- $\Delta$ *fliC* to induce both HIF-1 $\alpha$  expression and pro-angiogenic factor production. This could be explained by the fact that in the absence of bacterial adhesion, due to the lack of type 1 pili, less amount of flagella are in contact with transmembrane cellular receptors, such as Toll Like Receptor (TLR)-5. In agreement with this hypothesis, trans-complementation with *fimH* cloned gene led to an overexpression of IL-8, likely due to an overexpression of type 1 pili and consequently increased in TLR5 signaling.

Further, we and other<sup>26,27</sup> showed that AIEC LF82 bacteria induce expression of IL-8 in human cells. Expression of IL-8 has been described to be under the control of I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B signaling, downstream of TLR5.<sup>28</sup> In agreement with this, we showed that the IKK-2 inhibitor efficiently blocks IL-8 mRNA induction. However, our results demonstrate that IL-8 expression, in response to AIEC bacteria, is also dependent on the HIF-1 transcription factor since cells silenced for HIF-1 $\alpha$  produce less IL-8 when challenged with AIEC LF82. Such result is consistent with the existence of interdependence on HIF and NF $\kappa$ B.<sup>20</sup> It was shown that the NF $\kappa$ B pathway transcriptionally regulates HIF-1 $\alpha$  mRNA which subsequently leads to an increase in HIF-1 activity and transcriptional regulation of HIF-dependent genes.<sup>29,30</sup>

Accordingly, when we treated IEC with the IKK-2 inhibitor we observed a decrease in HIF-1 $\alpha$  protein levels suggesting that NF $\kappa$ B acts up-stream of HIF-1 $\alpha$ . Further, we observed that AIEC LF82 were unable to induce phosphorylation of I $\kappa$ B in cells invalidated for HIF-1 $\alpha$  expression. This result was surprising as we demonstrated in the same cells that the IKK complex was functional, since TNF $\alpha$  efficiently phosphorylated I $\kappa$ B. Reconsidering all these evidence we made the hypothesis that HIF-1 could transcriptionally regulate CEACAM-6 and TLR5. In such a scenario, in the absence of HIF-1 $\alpha$ , the expression of CEACAM-6 and TLR5 would be decreased; in return, bacteria wouldn't be able to induce the production of IL-8 and VEGF. Since the scanning of 5'-UTR of both CEACAM-6 and TLR5 genes using the "Tfsitescan" program highlights the presence of HIF-1 binding sites and since we noticed that cells depleted for HIF-1 $\alpha$  produced less angiogenic factors when challenged with AIEC LF82 bacteria, we believe that this hypothesis may be correct. In addition, HIF-1 $\alpha$  directly controls the transcription of IL-8, since a hypoxic responsive element has been identified on the IL-8 promoter.<sup>31</sup>

In epithelial cells, modulation of HIF by either chemical agents or gene silencing suggested a protective role for HIF proteins in murine experimental colitis.<sup>19</sup> However, results obtained from mice in which *hif-1 $\alpha$*  or *vhl* (the von Hippel-Lindau protein



**Figure 6.** Type 1 pili and flagella expressed by AIEC LF82 bacteria enhance production of VEGF and IL-8 independently of cellular invasion.

(A) Quantification of VEGF and IL-8 mRNA level by qPCR from LF82 or non-pathogen *E. coli* (clone 291071) infected T84 cells in the absence or presence of D-mannose (1%). D-mannose treatment partially inhibits LF82-induced VEGF and IL-8 mRNA expression. Data are expressed as the mean of the relative amount of mRNA expressed per  $8 \times 10^6$  cells  $\pm$  s.e.m. (n = 3). \*\*p < 0.01 relative to values of LF82-infected vs. 291071-infected T84 cells. ##, p < 0.01 relative to values of LF82-infected T84 cells in presence vs. absence of D-mannose. (B) Quantification of VEGF and IL-8 mRNA level by qPCR of bacteria (MOI = 10)-infected T84 cells showing the effect of LF82, LF82- $\Delta fimH$ , LF82- $\Delta fliC$  and LF82- $\Delta fliC/pPBI04$  (isogenic  $\Delta fliC$  mutant complemented for flagella and type 1 pili expression) bacteria. Type 1 pili ( $\Delta fimH$ ) and flagella ( $\Delta fliC$ ) are necessary to mediate LF82-induced increase on VEGF and IL-8 mRNA level. Data are expressed as the mean of the relative amount of mRNA in  $8 \times 10^6$  cells  $\pm$  s.e.m. (n = 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 relative to values of LF82-infected vs. commensal-infected T84 cells. (C) Quantification of VEGF and IL-8 mRNA levels in LF82-infected T84 cells without or with cytochalasin D treatment (2 $\mu$ g/ml). This result indicates that cellular invasion is not necessary to mediate LF-82-induced production of angiogenic factors. Data are expressed as the mean of amount of relative mRNA expressed in  $8 \times 10^6$  cells  $\pm$  s.e.m. (n = 3). ns: non statistically significant.

(VHL) were silenced in the intestinal epithelium showed contradictory results. In a study by Karhausen et al., *hif-1 $\alpha$*  deletion in mature enterocytes (triggered by the Fabp promoter) resulted in

worse trinitrobenzenesulfate acid (TNBS)-induced colitis whereas *vhl* deletion led to protection against TNBS-induced colitis. In contrast, Shah et al. reported that *hif-1 $\alpha$*  deletion in progenitors of intestinal epithelial cells (triggered by the villin promoter) had no effect on dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis, whereas deletion of *vhl* increased inflammatory response.<sup>32</sup> Whether these contradictory results could be explained by the chemical agents used in these two studies (TNBS vs. DSS), by the deleted cellular target (mature enterocytes vs. progenitors) or by the targeting of HIF- $\alpha$  subunits in *vhl* knockout mice (upregulation of HIF-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$  in the report of Karhausen et al. and only HIF-2 $\alpha$  in report by Shah et al.) requires additional experiments. Here, we sought to study the expression of HIF-1 $\alpha$  in a more physiological colitis murine model; thus far we infected transgenic CEABAC 10 mice with the virulent AIEC LF82 strain and demonstrated, for the first time, that bacteria associated with CD increased the level of HIF-1 $\alpha$  in epithelial cells. In both human and mice studies we also noted that some inflammatory cells are stained for HIF-1 $\alpha$ . This finding is in agreement with the observation that the HIF-1 $\alpha$  expressed by macrophages is an important regulator of innate

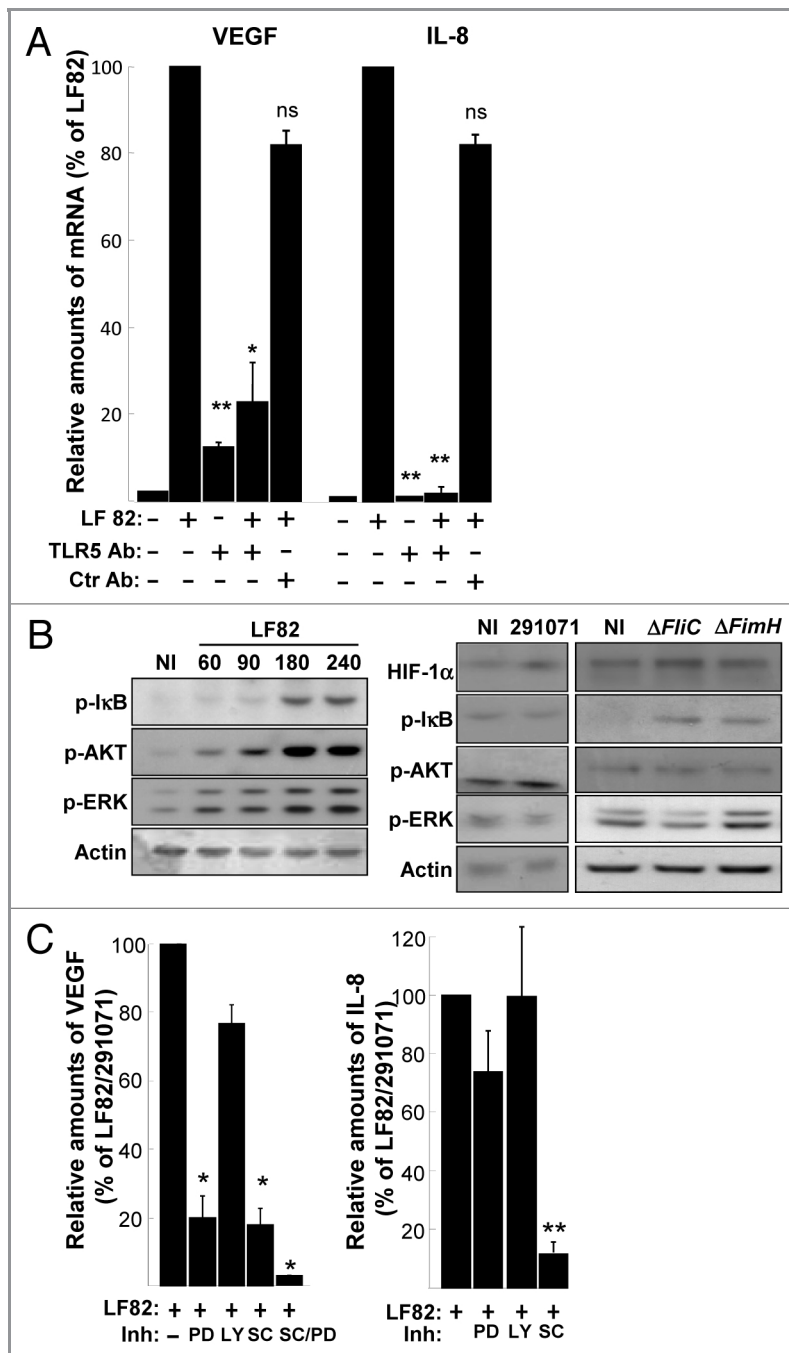
**Table 1.** Adherent and invasive characteristics of strains used in this study

Strains	Adherent bacteria		Invasive bacteria	
	Cfu/well x 10 <sup>5</sup> (a)	Relative % (b)	Cfu/well x 10 <sup>3</sup> (a)	Relative % (c)
AIEC LF82	45 ( $\pm$ 8)	100	14 ( $\pm$ 4)	0.3
AIEC LF82 +D-mannose	10 ( $\pm$ 2)	22	4 ( $\pm$ 1)	0.08
AIEC LF82 + cytochalasin D	42 ( $\pm$ 2)	93	2.8 ( $\pm$ 0.8)	0.06
AIEC LF82 - $\Delta fimH\Delta fliC$	5.5 ( $\pm$ 1.3)	12.2	1.7 ( $\pm$ 0.3)	0.04
AIEC LF82 - $\Delta fliC$	4.7 ( $\pm$ 1.9)	10.4	1.4 ( $\pm$ 0.25)	0.03
Cl. 291071	2 ( $\pm$ 0.1)	4	2 ( $\pm$ 0.05)	0.04
Cl. 291071 + D-mannose	2.1 ( $\pm$ 0.1)	4.6	2.1 ( $\pm$ 0.03)	0.04

<sup>a</sup>Mean of number of cell-associated bacteria well-1 ( $\pm$  SE); <sup>b</sup>Percentage of cell associated bacteria relative to that of wild-type LF82, defined as 100%;

<sup>c</sup>Percentage of intracellular bacteria relative to cell-associated LF82.





**Figure 7.** AIEC LF82-induced cell signaling pathways require binding of flagella to TLR5. (A) Quantification of VEGF and IL-8 mRNA by qPCR in LF82 (MOI = 10)-infected T84 cells pre-treated with anti-TLR5 and non-relevant antibodies indicates that LF82 bacterial component should interact with TLR5 to induce VEGF and IL-8 mRNA increase levels. Antibodies are added 1h prior to infection at 10  $\mu$ g/ml. Data are expressed as the mean of the relative amount of mRNA expressed by  $8 \times 10^6$  cells  $\pm$  s.e.m. (n = 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 relative to values of LF82-infected vs. commensal-infected T84 cells. (B) Immunoblot showing HIF-1 $\alpha$  and phosphorylation of ERK, AKT and I $\kappa$ B in T84 cells before and after exposure to LF82 bacteria (MOI = 10) for indicated times (left panel) or indicated bacteria at a MOI of 10 for a 2 h period (right panel). The total actin level is monitored as a control for equal protein loading. Here we show that LF82 bacteria induce classical ERK, AKT and I $\kappa$ B signaling pathways. (C) Effect of cell signaling inhibitors on VEGF and IL-8 gene expression of LF82-infected T84 cells. MEK inhibitor (PD184352, 5  $\mu$ M), PI-3 Kinase inhibitor (LY203580, 25  $\mu$ M) and IKK inhibitor (SC-514, 100  $\mu$ M) were added to the cells 1h prior to infection. ERK and I $\kappa$ B dependent signaling pathways are required to mediate LF82-induced production of angiogenic factors. Data are expressed as the mean of the relative amount of mRNA expressed by  $8 \times 10^6$  cells  $\pm$  s.e.m. (n = 4). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 relative to values of LF82-infected vs. commensal-infected T84 cells.

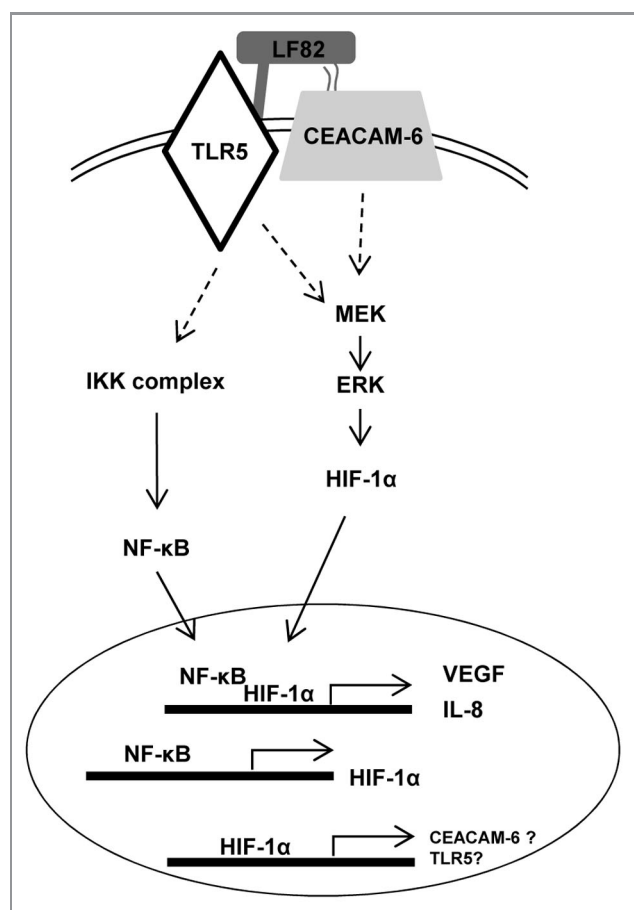
signaling also participates in regulation. Interestingly, we demonstrate that the activation of the flagella/TLR5 signaling pathway accounted for enhanced VEGF production. In humans, expression of VEGF and its inducible receptor, VEGFR-2/KDR, are increased in IBD patients. Modulation of VEGF, or of VEGFR-2, expression in a DSS-induced colitis murine model demonstrates that VEGF links angiogenesis to inflammation.<sup>14</sup> Our results suggest that AIEC could participate in the pathogenesis of CD by increasing locally VEGF/VEGFR-2 signaling and IL-8 production.

The angiogenic switch results in the transition from dormant avascularized hyperplasia to outgrowing vascularized tumors and, eventually, to malignant tumor progression. In the present study, we demonstrated that AIEC LF82 bacteria isolated from a CD patient induce production of pro-angiogenic factors.

Since angiogenesis is linked to carcinogenesis, it is tempting to propose that bacteria might favor the onset of colon cancer in CD patients. Indeed, increased numbers of mucosa-associated *E. coli* forming a biofilm on the surface of the gut mucosa are observed in patients with colorectal cancer<sup>34</sup> and a subset of mucosa-associated *E. coli* isolated from patients with colorectal cancer share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*.<sup>35</sup> The observations that: (1) similar mucosa-associated *E. coli* are detected both in cancer and CD and (2) infection of CEABAC 10 mice by AIEC induced the production of angiogenic factors, raises the possibility that colorectal cancer might be the result of bacteria-induced inflammation.

immunity.<sup>33</sup> Our results suggest that HIF-1 $\alpha$  expression in response to AIEC LF82 bacteria was independent of hypoxia. Because AIEC LF82 bacteria induced an increase in HIF-1 $\alpha$  protein synthesis and because AIEC LF82 bacteria-increased gene expression was mediated by flagella/TLR5 signaling, we believe that CD-associated bacteria act through classical microbial sensing via pattern recognition receptors.

We demonstrate here that AIEC-infected mice and T84 cells secrete VEGF. This cellular response is, in part, mediated by HIF-1 signaling, since we noted a decrease in cells silenced for *hif-1 $\alpha$* . Given the fact that a combination of ERK and IKK-2 inhibitors efficiently blocks VEGF production, it is likely that NF $\kappa$ B



**Figure 8.** AIEC LF82 bacteria induce inflammatory disorders via HIF-dependent responses. Binding of AIEC LF82's type 1 pili and flagella to CEACAM-6 and TLR-5 receptors triggers induction of signaling pathways (IKK, MAPK). Consequently, NFκB and HIF-1α translocate to the nucleus where they cooperatively control VEGF and IL-8 transcription. Since AIEC are unable to induce phosphorylation of IκB in cells silenced for HIF-1α expression, we proposed that the expression of CEACAM-6 and TLR-5 receptors is under the control of the HIF-1 transcription factor.

## Materials and Methods

**Ethics statement.** Human research: all study participants and/or their legal guardians provided written, informed consent and all study participants signed agreement for this study. The protocol was approved by the local ethics committee of the University of Nice (n° 77643).

**Animal research:** This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the University of Clermont Ferrand France. Animal protocol was approved by the committee for Research and Ethical Issues of Auvergne department (CEMEA, Auvergne) following international directive 86/609/CEE (n° CE16-09).

**Patients and biopsy specimens.** Patients included in this study were hospitalized in the Department of Gastroenterology (Archet II Hospital, Nice, France). Intestinal biopsies were obtained from macroscopically inflamed mucosa of the terminal ileum and of the

colon in 85 CD patients (group 1) and from macroscopically non-inflamed mucosa of the terminal ileum and of the colon in 95 CD patients (group 2). There were 97 men and 83 women, with a mean age of 42 y (range 19–62) and mean disease duration of 15 y (range 2–25). Patients were all French Caucasian residents. In addition, biopsies were taken from the ileum and colon of 48 control patients consisting of individuals who had no significant pathological findings following endoscopic examination for changes in stool habits, abdominal pain, or upper gastrointestinal bleeding or cancer surveillance.

**Bacterial strains and CEABAC 10 mice.** *E. coli* LF82, isolated from a chronic ileal lesion of a CD patient, a non-flagellated isogenic mutant of AIEC LF82 deleted of the AIEC-LF82- $\Delta$ *fliC* gene and the corresponding mutant transcomplemented with pPB104 harboring the entire *fliC* operon,<sup>22</sup> a non-piliated isogenic mutant, deleted for *fimH* gene and the corresponding mutant transcomplemented with *fimH* gene,<sup>36</sup> and a control commensal bacteria, strain 291071 which was isolated from stool of healthy individuals, were used in this study. Bacteria were cultured as previously described.<sup>37</sup>

WT (FVB/N) mice were purchased from Charles River Laboratories and CEABAC 10 transgenic mice were obtained from Chan and Stanners.<sup>38</sup> All mice were housed and infected as previously described.<sup>6</sup>

**Cell culture and invasion assays.** The human colon carcinoma cell line T84 was supplied by the ATCC (number CCL-248). Cells were cultured as a monolayer for 2–3 d to confluency in DMEM: F12 medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) without antibiotics. Human *hif-1α*-silenced T84 (Sh*hif-1α*) T84 cells were transduced with lentiviral particles containing shRNA-HIF-1α from Sigma-Aldrich (TRCN0000003810) as described previously.<sup>39</sup> Prior to infection, cells were starved for 24 h in the medium without FCS and then infected with bacteria as indicated in figure legends.

**Reagents and antibodies.** Human TNFα was from PeproTech. The following inhibitors Ly203580 (Calbiochem), PD 184352 (M. Kohno, University of Nagasaki), SC-514 (Cayman Chemicals) were used. Anti-HIF-1α antibody (BD Transduction), anti-phospho-IκB-α (Ser 32/36) and anti-phospho-Akt (Ser 473) (Cell Signaling Technology), anti-actin (clone AC40) and anti-phospho-ERK (Sigma) were used for immunoblot analysis. Anti-mouse HIF-1α (NB100-105, Novus), VEGF (AF-493, R&D System) and VEGFR-2 (GTX73105, GeneTex) were used for immunohistochemistry. Anti-TLR5 (PAb-hTLR5 -Cayla-In VivoGen- 5 μg/ml) was incubated with cells for 30 min prior to bacterial infection.

**Tissue microarray (TMA) construction and immunohistochemistry.** Representative intestinal biopsies obtained for each individual in building TMAs were selected from hematoxylin and eosin stained sections. These sections were examined by two pathologists (VH, PH) who were blinded to the other experimental results. EDTA-pretreated sections were immunostained for HIF-1α (mouse, clone 54; diluted 1 to 10) by using an automated single-staining procedure (Benchmark XT, Ventana Medical Systems, Roche Group, Inc., Tucson, AR). HIF-1α staining was quantified with an image analysis workstation (Spot



Browser version 7; Alphelys, Paris, France), as described previously.<sup>40</sup> Briefly, after antibody staining, images were acquired using automated quantitative analysis. The HIF-1 $\alpha$  signal was measured on a grayscale of 0 (black) to 255 (white) and gray values ranged between 0 and 152, and a value superior or equal to 35 was arbitrarily defined as HIF-1 $\alpha$  overexpression. Results were expressed as positive cell density per mm<sup>2</sup>.

**Protein gel blotting.** Cells seeded in a 12-well plate were washed twice with ice-cold PBS and immediately lysed in SDS sample buffer. Protein extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore). Prior to incubation with the antibodies, membranes were saturated for 30 min in 5% non-fat milk diluted in 50 mM TRIS-HCl 150 mM NaCl (TN buffer). Membranes were incubated overnight in the same buffer containing the indicated antibody, washed in TN supplemented with 0.1% Triton X-100 (TNT) three times and finally with TN buffer. Membranes were then incubated with the secondary anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase conjugated antibody. Bound antibodies were revealed using an ECL system (Pierce).

**VEGF, KC and IL-8 measurements.** VEGF, KC and IL-8 secretion from mice colon was measured using a specie specific ELISA kits from PEPROTECH (Co, UK) according to the manufacturer's protocol.

**RT-qPCR procedure.** Total RNA were prepared as previously described.<sup>39</sup> Each sample was run in duplicate. All results were normalized to the unaffected housekeeping GAPDH gene. For human IL-8 (Hs00174103-m1) and VEGF (Hs00173626-m1), cDNA were quantified using a 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The relative expression of the indicated transcripts was quantified using the Taqman PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers using the 2<sup>[- $\Delta\Delta C_T$ )] method. According to this method, the C (T) values for the expression of each transcript in each sample was normalized to the C (T) values of the control mRNA (36B4; Hs99999902-m1)</sup>

of the same sample. The values of untreated cell samples were then set to 1 and the fold increase was calculated. The sense and antisense oligonucleotides used were GAPDH, 5'-ATGGCC-TTCCGTGTTCTCTAC-3' and 5'-CAGATGCCTGCTTCA-CCAC-3'; HIF-1 $\alpha$ , 5'-GAAACGACCACTGCTAAGGCA-3' and 5'-GGCAGACAGCTTAAGGCTCCT-3' respectively.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed using a one-tailed Mann Whitney test. TMA assays were compared using the Student's t-test. The association of HIF-1 $\alpha$  expression with categorical pathological features was made using X<sup>2</sup> analysis. Calculations and analyses were performed with SPSS 11.5 for Windows (SPSS, Inc.), and when appropriate, were two-tailed. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

#### Disclosure of potential conflicts of interest

None of the authors have a conflicting financial interest regarding this research.

#### Acknowledgments

We thank Dr V. Hofman for pathological expertise, Agnès Loubat for flow cytometry analysis and Dr Chan and Pr Stanners (McGill University) for the CEABAC 10 mice. Studies in the research unit INSERM ERI21/EA4319 were supported by the «Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale», the Institut National du Cancer (Grant Vancol n° R07129AA), the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de l'Education, de la Recherche et de la Technologie, and by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, subvention 1142), Association François Aupetit » and « Fondation Infectiopol Sud. Studies in the research unit JE2526 Université d'Auvergne were supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, by the Institut National de la Recherche Agronomique (USC 2018) and by grants from Association F. Aupetit (AFA). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

#### References

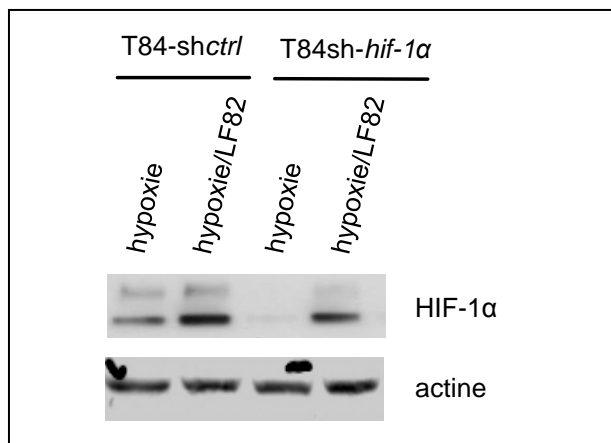
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124:837-48; PMID: 16497592; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>
- Inagaki H, Suzuki T, Nomoto K, Yoshikai Y. Increased susceptibility to primary infection with *Listeria monocytogenes* in germfree mice may be due to lack of accumulation of L-selectin+ CD44+ T cells in sites of inflammation. *Infect Immun* 1996; 64:3280-7; PMID:8757865
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448:427-34; PMID:17653185; <http://dx.doi.org/10.1038/nature06005>
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347:417-29; PMID:12167685; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra020831>
- Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2007; 42:16-25; PMID: 17322989; <http://dx.doi.org/10.1007/s00535-006-1995-7>
- Carvalho FA, Barnich N, Suvignon A, Darcha C, Chan CH, Stanners CP, et al. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 2009; 206:2179-89; PMID: 19737864; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20090741>
- Carvalho FA, Barnich N, Sauvanet P, Darcha C, Gelot A, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14:1051-60; PMID:18338780; <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20423>
- Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantschke P, Allez M, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007; 117:1566-74; PMID:17525800; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI30504>
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006; 441:437-43; PMID:16724055; <http://dx.doi.org/10.1038/nature04871>
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16:4604-13; PMID: 8756616
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-4; PMID:9109485; <http://dx.doi.org/10.1038/386671a0>
- Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6735-41; PMID: 18980965; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>
- Danese S, Sans M, Spencer DM, Beck I, Donate F, Plunkett ML, et al. Angiogenesis blockade as a new therapeutic approach to experimental colitis. *Gut* 2007; 56:855-62; PMID:17170016; <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2006.114314>
- Scaldaferri F, Vetrano S, Sans M, Arena V, Straface G, Stigliano E, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2009; 136:58595; PMID:19013462; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.064>

15. Mariani F, Sena P, Marzona L, Riccio M, Fano R, Manni P, et al. Cyclooxygenase-2 and Hypoxia-Inducible Factor-1alpha protein expression is related to inflammation, and up-regulated since the early steps of colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett* 2009; 279: 221-9; PMID:19268443; <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.001>
16. Giattromanolaki A, Sivridis E, Maltezos E, Papazoglou D, Simopoulos C, Gatter KC, et al. Hypoxia inducible factor 1alpha and 2alpha overexpression in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 2003; 56:209-13; PMID:12610101; <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.56.3.209>
17. Vannay A, Sziksz E, Prokai A, Veres G, Molnar K, Nagy Szakal D, et al. Increased expression of hypoxia inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res* 2010; 68:11822; PMID:20453713; <http://dx.doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181e5bc96>
18. Rolhion N, Barnich N, Bringer MA, Glasser AL, Ranc J, Hebuterne X, et al. Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive Escherichia coli invasion. *Gut* 2010; 59:1355-62; PMID:20587550; <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2010.207456>
19. Cummins EP, Seeballuck F, Keely SJ, Mangan NE, Callanan JJ, Fallon PG, et al. The hydroxylase inhibitor dimethylxalylglycine is protective in a murine model of colitis. *Gastroenterology* 2008; 134:156-65; PMID:18166353; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.012>
20. Taylor CT. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *J Physiol* 2008; 586:4055-9; PMID:18599532; <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.157669>
21. Krogfelt KA, Bergmans H, Klemm P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of Escherichia coli type 1 fimbriae. *Infect Immun* 1990; 58:1995-8; PMID:1971261
22. Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* 2003; 48:781-94; PMID:12694621; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03468.x>
23. Smith KD, Ozinsky A. Toll-like receptor-5 and the innate immune response to bacterial flagellin. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270:93-108; PMID:12467246; [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59430-4\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59430-4_6)
24. O'Neill LA, Bryant CE, Doyle SL. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev* 2009; 61:177-97; PMID:19474110; <http://dx.doi.org/10.1124/pr.109.001073>
25. Pages G, Pouyssegur J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene—a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65:564-73; PMID:15664382; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.09.032>
26. Eaves-Pyles T, Allen CA, Taormina J, Swidsinski A, Tutt CB, Jezek GE, et al. Escherichia coli isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int J Med Microbiol* 2008; 298:397-409; PMID:17900983; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.05.011>
27. Semiramoth N, Gleizes A, Turbica I, Sandre C, Gorges R, Kansau I, et al. Escherichia coli type 1 pili trigger late IL-8 production by neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through a Src family kinase- and MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 2009; 85:310-21; PMID:19015376; <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0608350>
28. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; 167:1882-5; PMID:11489966
29. Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* 2006; 396:517-27; PMID:16533170; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20051839>
30. Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J* 2003; 370:1011-7; PMID:12479793; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20021279>
31. Kim KS, Rajagopal V, Gonsalves C, Johnson C, Kalra VK. A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride- and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells. *J Immunol* 2006; 177:7211-24; PMID:17082639
32. Shah YM, Ito S, Morimura K, Chen C, Yim SH, Haase VH, et al. Hypoxia-inducible factor augments experimental colitis through an MIF-dependent inflammatory signaling cascade. *Gastroenterology* 2008; 134:203648; PMID:18439915; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.009>
33. Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, et al. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* 2010; 120:2699-714; PMID:20644254; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI39506>
34. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, et al. Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004; 127:80-93; PMID:15236175; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.03.054>
35. Bronowski C, Smith SL, Yokota K, Corkill JE, Martin HM, Campbell BJ, et al. A subset of mucosa-associated Escherichia coli isolates from patients with colon cancer, but not Crohn's disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic E. coli. *Microbiology* 2008; 154:571-83; PMID:18227261; <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/013086-0>
36. Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Type 1 pili-mediated adherence of Escherichia coli strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol* 2001; 39:1272-84; PMID:11251843; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02315.x>
37. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998; 115:1405-13; PMID:9834268; [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70019-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70019-8)
38. Chan CH, Stanners CP. Novel mouse model for carcinoembryonic antigen-based therapy. *Mol Ther* 2004; 9:775-85; PMID:15194045; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.03.009>
39. Cane G, Ginouves A, Marchetti S, Busca R, Pouyssegur J, Berra E, et al. HIF-1alpha mediates the induction of IL-8 and VEGF expression on infection with Afa/Dr diffusely adhering E. coli and promotes EMT-like behaviour. *Cell Microbiol* 2010; 12:640-53; PMID:20039880; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01422.x>
40. Ilie M, Mazure NM, Hofman V, Ammadi RE, Ortholan C, Bonnetaud C, et al. High levels of carbonic anhydrase IX in tumour tissue and plasma are biomarkers of poor prognostic in patients with non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2010; 102:1627-35; PMID:20461082; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605690>

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES PAPIER 1

Les résultats de cet article démontrent que l'infection par les bactéries AIEC LF82 se traduit par une augmentation de l'expression de la protéine HIF-1 $\alpha$  au niveau de l'iléon de patients MC en phase d'inflammation aigue, dans les colons de souris CEABAC10, des souris compétentes pour l'infection par les bactéries LF82, et dans un modèle de cellules épithéliales intestinales (CEI). Plusieurs études ont reporté une accumulation de HIF-1 $\alpha$  en réponse à une infection virale [<sup>245</sup>] et bactériennes dans différentes lignées cellulaires [<sup>130</sup>; <sup>246</sup>; <sup>247</sup>; <sup>248</sup>]. Cependant, cette augmentation n'avait pas été corrélée avec une étude sur biopsies de patients MICI.

Nos résultats démontrent aussi une augmentation de l'expression du VEGF, de son récepteur VEGFR2 ainsi que de l'IL-8 spécifiquement en réponse aux AIEC. Cette augmentation est dépendante de l'expression de HIF-1 $\alpha$ . L'implication de bactéries Gram négatives dans l'induction d'une réponse pro angiogénique HIF-1 $\alpha$  dépendante a déjà été démontrée [<sup>248</sup>; <sup>134</sup>]. Ici nous mettons en évidence une réponse pro angiogénique et pro inflammatoire en réponse aux AIEC isolées de patients MICI. La muqueuse intestinale d'un patient MICI présente une faible concentration en O<sub>2</sub> et l'inflammation induit une hypoxie locale. Cette hypoxie locale n'est pas à l'origine de la réponse observée car l'infection avec une souche *E.coli* K12 ou un mutant AIEC non adhérent, n'induit pas l'augmentation du VEGF et de l'IL-8. De plus, nous avons montré que l'augmentation de HIF-1 $\alpha$  préalablement observée dans les cellules est aussi indépendante de l'hypoxie.



L'augmentation du niveau de HIF-1 $\alpha$  en réponse aux AIEC LF82 plus hypoxie est nettement plus élevé que celui observé en réponse à l'hypoxie seule dans les cellules invalidées pour HIF-1 $\alpha$  ainsi que dans les cellules contrôles. Ce qui prouve que l'effet

observé de HIF-1 $\alpha$  dans notre papier est indépendant de celui induit par l'hypoxie.

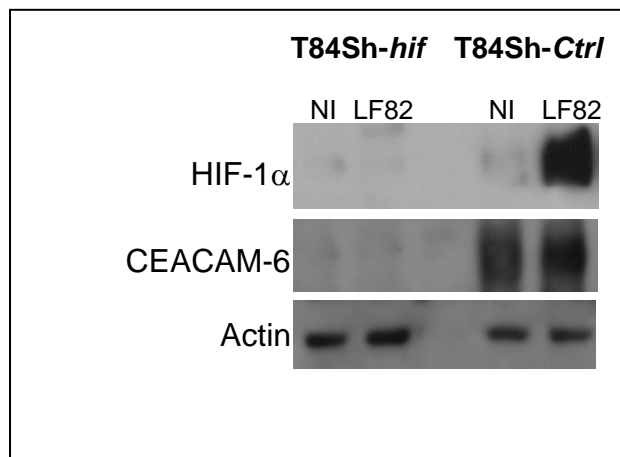
Le récepteur TLR5 est activé par la liaison des flagellines bactériennes et cette activation induit la production de cytokines pro-inflammatoires (comme IL-6 et IL-1 $\beta$ ) [249]. Ici nous démontrons que les pili de type 1 et les flagelles signalent via CEACAM6 et TLR5 induire IL-8 et VEGF. Etant donné que l'expression du pili de type 1 est dépendante de celle du flagelle chez les AIEC [249], il serait intéressant de comparer l'expression de ces facteurs en réponse aux facteurs bactériens purifiés, flagelline et/ou pili de type 1 afin de mieux caractériser les réponses induites par chacun de ces facteurs.

La reconnaissance des flagelles par le récepteur TLR5 dépend d'un domaine spécifique très fortement conservé chez les différentes souches bactériennes. Cette relation hôte/pathogène est physiologiquement impliqué dans la clearance des bactéries ; ainsi, certaines bactéries sont capables de synthétiser des flagelles dont ce domaine de reconnaissance est muté pour échapper à cette reconnaissance [250]. Il est possible de penser que cette reconnaissance entre cellules épithéliales intestinales et flagelle s'est mise en place pour discriminer souches pathogènes flagellées des souches non pathogènes peu ou non flagellées au niveau de l'intestin. Il est donc important d'identifier spécifiquement les flagelles afin de déterminer l'implication d'une souche particulière dans la pathogenèse d'une

maladie dans laquelle son rôle est suspecté. Dans cette optique, une étude en 2012 évoque la possibilité d'utiliser des anticorps anti-flagelline spécifiques d'une souche bactérienne comme vaccins contre cette même souche [251].

Le facteur de transcription HIF-1 est connu pour être activé par les voies NFκB et MAPK. Ces voies de signalisation sont activées au cours de l'inflammation ainsi que l'angiogenèse. Nous avons mis en évidence le rôle de chacune de ces voies dans la réponse des CEI aux AIEC. De manière intéressante, alors que la réponse pro angiogénique (augmentation de l'ARNm VEGF) est transmise par les voies NFκB et MAPK, la réponse pro inflammatoire (augmentation d'ARNm IL-8) est médiée par NFκB uniquement.

Cette étude met aussi en évidence une régulation complexe entre HIF-1 et NFκB. La régulation positive de HIF-1α par NFκB au niveau transcriptionnel est bien décrite [136 ; 252 ; 253]. Mais le défaut d'activation de NFκB dans les cellules invalidées pour l'expression HIF-1α en réponse aux AIEC laisse à penser que d'une part un signal dépendant de la liaison des AIEC et cellules épithéliales est à l'origine de l'activation de NFκB et que d'autre part ce signal est dépendant de HIF-1α. Nous avons émis l'hypothèse que la régulation de l'expression des récepteurs TLR5 et CEACAM6 serait dépendante de HIF-1. En accord avec cette hypothèse, nous avons trouvé des sites Hypoxia Responsive Element (HRE) en amont des promoteurs TLR5 et CEACAM6. De plus, nous avons pu montrer par des expériences de western blot que la protéine CEACAM6 est beaucoup moins exprimée dans les cellules T84-Shhiflα.



La diminution relative de ces protéines impliquées dans la liaison des bactéries, ici CEACAM6, est tout à fait compatible avec un défaut d'activation de la voie NFκB,

visualisé dans notre papier par un défaut de phosphorylation de l'inhibiteur IKKα. Il serait intéressant de regarder si les autres voies de signalisation ne sont pas impactées elles aussi.

Il existe d'autres protéines HIFs (HIF-2 et HIF-3) dont le rôle dans la réponse à l'infection aux AIEC reste à déterminer. Ceci est d'autant plus relevant puisque la sous unité HIF-2α est exprimée au niveau de l'intestin et que le facteur HIF-2 a récemment été décrit comme jouant un rôle dans la régulation du métabolisme du fer. De plus, la régulation de NFκB par HIF implique une interaction entre la sous unité IKKγ du complexe IKK et HIF-2α ce qui augmente l'activité transcriptionnelle de HIF-2 en condition non hypoxique [254].

Enfin, le lien entre pathogènes, inflammation chronique et cancer est bien établi. Dans notre étude nous avons utilisé les bactéries AIEC LF82 car elles ont été isolées chez des patients MICI. Nous avons démontré leur capacité à induire une réponse pro-inflammatoire et pro-angiogénique, deux processus essentiels à la progression tumorale. De façon tout à fait intéressante une bactérie gram négative adhérente, *Helicobacter pylori*, a clairement été incriminée comme agent étiologique de la gastrite chronique et comme un facteur de risque pour le cancer gastrique [255]. Par analogie, nous proposons que les AIEC puissent jouer un rôle dans le développement des cancers coliques chez des patients MICI.

Dans le cadre de perspectives futures pour ce travail, il serait intéressant de mettre en place un modèle murin qui répond à une infection chronique par les AIEC afin de suivre l'apparition des tumeurs coliques.

## INTRODUCTION PAPIER 2

Comme je l'ai détaillé dans mon introduction de thèse, l'autophagie est un mécanisme intracellulaire qui se caractérise par un flux de dégradation de composés cytosoliques de différentes origines. Ce mécanisme est divisé en différents types, en fonction des composés qu'il dégrade [<sup>193</sup>]. Parmi ces types, la xénophagie est l'autophagie spécialisée dans la prise en charge des microbes [<sup>256</sup>]. Un défaut dans le processus autophagique a récemment été relié à plusieurs pathologies dont les MICI et certains types de cancers [<sup>257</sup>; <sup>258</sup>]. De plus, un défaut autophagique, a été décrit comme favorisant la survie et la multiplication de bactéries dans des neutrophiles, des macrophages et des cellules épithéliales intestinales [<sup>169</sup> ; <sup>170</sup> ; <sup>171</sup>].

La prise en charge des bactéries intracellulaires en réponse à une infection se fait par différents mécanismes de dégradation dont la phagocytose et la xénophagie. Les AIEC sont des *E coli* entéropathogènes. Nous avons discuté, dans mon premier papier, de la possible implication de ces bactéries dans la pathogenèse des MICI et du rôle prépondérant du facteur HIF-1 dans cet effet [<sup>259</sup>]. Au laboratoire, il a été montré que les AIEC LF82 survivent et prolifèrent dans des cellules épithéliales intestinales ; cette survie est favorisée dans des cellules qui présentent un défaut autophagique [<sup>260</sup>; <sup>257</sup>].

Il est bien établi que certains microbes, dont plusieurs souches bactériennes pathogènes, échappent ou détournent le processus autophagique à leur profit afin d'éviter leur élimination [<sup>171</sup> ; <sup>261</sup> ; <sup>223</sup> ; <sup>233</sup> ; <sup>216</sup> ; <sup>262</sup>]. Le laboratoire d'A. Darfeuille-Michaud ayant démontré que la prise en charge des AIEC par la phagocytose se faisait normalement [<sup>260</sup>], nous avons émis l'hypothèse qu'il existait d'autres mécanismes associés à la survie des AIEC, parmi lesquels la xénophagie.

D'une part, nous avons vu dans mon premier article qu'en réponse à l'infection AIEC LF82, on observe une augmentation de l'expression de la sous unité HIF-1 $\alpha$  dans les CEI,



d'autre part, comme je l'ai détaillé dans l'introduction de cette thèse, HIF-1 est connu pour induire le processus autophagique. Nous avons alors émis l'hypothèse que HIF-1 pourrait jouer un rôle dans la dégradation xénophagique des AIEC. L'objectif de mon deuxième article était de démontrer cette hypothèse.

Nos résultats qui seront soumis à la revue *Autophagy*, mettent en évidence un rôle non canonique de HIF-1 $\alpha$  dans la xénophagie des AIEC.

# **HIF1A regulates xenophagic degradation of Adherent and Invasive *Escherichia coli* (AIEC)**

Sanda Mimouna<sup>1,2</sup>, Baharia Mograbi<sup>1,2</sup>, Paul Hofman<sup>1,2,3</sup> and Valérie Vouret-Craviari<sup>1,2, #</sup>

1: Institute for Research on Cancer and Aging, Nice, France; IRCAN U1081 UMR CNRS/UNS 7284

2: University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France;

3: Laboratory of Clinical and Experimental Pathology and Biobank, Pasteur Hospital, Nice, France

**#Corresponding Author:** Mailing address: IRCAN, Inserm U1081, UMR 7284 CNRS/Université Nice-Sophia Antipolis, 28 Avenue de Valombrose, 06108 Nice, France. Phone: (33)4-92-03-12-23. Fax: (33) 4 92 03 12 41. **E-mail:** [vouret@unice.fr](mailto:vouret@unice.fr)

**Running title:** HIF1A regulates xenophagy

**Abstract** 250 words max

Adherent Invasive *E. coli* (AIEC) colonize ileal lesions of Crohn's disease (CD) patients and participate in the pathogenesis of this chronic inflammatory disorder. We have published that AIEC promote gastrointestinal inflammatory disorders by activation of hypoxia inducible factor (HIF)-dependent responses. HIF-1 is described to induce the general macro-autophagy pathway; we therefore aim to characterize its contribution in xenophagy, a specialized form of autophagy involved in degradation of intracellular bacteria. We show here that AIEC survival in intestinal epithelial cells deficient for HIF1A expression is increased by 3 fold. Of particular interest, AIEC survival is increased to the same extend in cells deficient for ATG5 and SQSTM1 (p62). This survival depends on the inhibition of the autophagic flux at the autolysosomal maturation step. Using pangenomic microarray screening we identified HIF1A potential targets on the basis of their negative regulation in cells silenced for HIF-1 $\alpha$  expression and their role in lysosomal maturation/activity. In conclusion, our results evidenced a new function for HIF1A in AIEC-dedicated xenophagy.

**Keywords:** Hypoxia inducible factor, bacteria, autophagy, Crohn's disease, lysosome

## Introduction

The hypoxia inducible transcription factor family comprises 3 members, HIF1, HIF2 and HIF3, composed of a specific oxygen-sensitive alpha subunit and a common beta-subunit (also known as the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT). Both subunits are constitutively expressed, but only the alpha subunit is degraded via an oxygen-dependent process involving prolyl hydroxylases, which have been described as oxygen sensor (Maxwell et al., 1999). To date, HIF1A is the most studied alpha subunit. In response to a reduction in oxygen tension, stabilized HIF1A migrates to the nucleus, binds HIF1B to form HIF1 which then binds to hypoxic response element to trigger up-regulation of a panel of genes which, in turn, maintain biological homeostasis (Semenza, 2011). Apart the well described HIF1 activation under hypoxia, it is now admitted that HIF1A accumulation and transcriptional activation can result from growth factors or LPS challenge (Richard et al., 2000) and inflammatory conditions (Frede et al., 2007). Further, we recently demonstrated that HIF1A promotes the induction of angiogenesis and inflammation on infection with *E. coli* enteropathogenic strains (Cane et al., 2010; Mimouna et al., 2011).

Autophagy is an ancestral pathway which maintains the cellular homeostasis by degrading long lived proteins and removing unwanted or unnecessary intracellular components (Semenza, 2011). Likewise, many reports have highlighted multiple roles of autophagy in the regulation of cell death, differentiation, immunity and anti-microbial response in mammals (Levine and Deretic, 2007; Mizushima et al., 2008). Autophagy is a multistep process starting with the formation of a double-membrane vesicle, named phagophore, which sequesters cytosolic components. Once the vesicle is closed it becomes an autophagosome which further fuses with lysosome to form an autolysosome where the content is degraded (Klionsky et al., 2012). As a chief orchestrator of gene induction, HIF1A drives autophagy. Mechanisms underlying this regulation involve hypoxia-induced BNIP3/BNIP3L which, by disrupting the Bcl-2–Beclin1 complex, increases the level of free Beclin1 and therefore facilitate genesis of the phagophore (Bellot et al., 2009). Xenophagy is the type of autophagy that targets and degrades intracellular bacteria (Levine, 2005). Some bacteria have been described as able to impair this process or exploit it in order to survive into the cells (Pujol et al., 2009). This is the case of Adherent Invasive *E. coli* (AIEC) which can be found within autophagosome of cells of the hematopoietic lineage (Chargui et al., 2012;

Lapaquette et al., 2012) and epithelial cells (Brest et al., 2011; Lapaquette et al., 2010). Interestingly enough, intracellular survival of bacteria leads to increase in production of inflammatory cytokines.

AIEC, which colonize ileal mucosa of Crohn's disease (CD) patients (Baumgart et al., 2007; Darfeuille-Michaud et al., 1998), participate in the pathogenesis of this inflammatory bowel disease (IBD) by increasing pro inflammatory and pro angiogenic responses (Mimouna et al., 2011). In the last decade, genome wide association studies (GWA) revealed IBD as complex multigenic disorders and emphasized CD as an autophagy disease (Brest et al., 2010). In particular, *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1) and *IRGM* (Immunity-Related GTPase M), two autophagy genes, were related to CD; these observations were confirmed in mouse models where *ATG16L1* and *IRGM* are required for bacterial clearance (Kuballa et al., 2008). In agreement with these reports, we have demonstrated that a tight regulation of *IRGM* expression compromises control of intracellular replication of AIEC by autophagy (Brest et al., 2011).

Much evidence suggests that HIF1A participate in xenophagy. First, HIF1A induces autophagy and mitophagy that corresponds to autophagic degradation of mitochondria which are nothing else than ancestral proteobacteria. Second, AIEC induce HIF1A accumulation and autophagy participates in the clearance of AIEC. However, to our knowledge, the role of HIF1A in xenophagy has not been elucidated to date. Here we demonstrated that HIF1A regulates xenophagic degradation of AIEC in intestinal epithelial cells.

## Results

### Intracellular survival of AIEC depends on HIF1A in intestinal epithelial cells

We have previously demonstrated that AIEC LF82 bacteria promote gastrointestinal inflammatory disorders by activation of hypoxia inducible factor (HIF)-dependent responses (Mimouna et al., 2011). HIF-1 is described to induce the general macro-autophagy pathway; we therefore aim to characterize its contribution in the particular AIEC-dedicated xenophagy. For that purpose we used our HIF1A silenced T84 intestinal epithelial cells (T84-Sh*HIF1A*) (Cane et al., 2010). As shown in Figure 1A, the intracellular survival of AIEC LF82 bacteria is 2.5 fold higher into cells silenced for HIF1A compared to cells transduced with control empty vector (Sh*CTR*). Further, we have analyzed AIEC LF82 intracellular survival in cells silenced for two proteins involved in the autophagic machinery, namely SQSTM1 (p62) and autophagic protein 5 (ATG5). We have observed that AIEC survival is increased in both cell lines, with a 2.5 fold increase for SQSTM1 and 2 fold for ATG5 as compared to control silenced cells. To bring additional evidence of a role of HIF1A in AIEC intracellular survival, we have examined intracellular bacteria via transmission electron microscopy (Figure 1B). Sixteen hours after infection of T84-Sh*CTR* cells, electron dense bacteria are present within multi-lamellar vesicles. Bacteria localized within double membrane vesicle are likely being degraded, since we have observed loss of bacterial membrane and regular round shape (Figure S1). In contrast, in cells silenced for HIF1A, SQSTM1 and ATG5 round shape bacteria are surrounded by bacterial membrane. Whereas healthy electron dense AIEC bacteria are intra cytoplasmic in Sh*SQSTM1* and Sh*ATG5* cells, we have noticed that AIEC are co-localized with cytoplasmic materials into intracellular vesicles in Sh*HIF1A* cells.

### HIF1A allows AIEC targeting to functional autophagolysosomes

Since we have brought evidence for a role of HIF1A in degradation of intracellular AIEC, we wondered whether HIF1A impacts AIEC LF82-induced autophagic machinery. Activation of autophagy was assayed by formation of microtubule-associated protein 1 light chain 3-II (LC3-II) by western blot experiments. As shown in Figure 2A, infection of T84-Sh*CTR* with AIEC LF82 bacteria induced the formation of LC3-II, confirming that live AIEC are efficient inducers of autophagy in intestinal epithelial cells. Interestingly, we observed that AIEC

induced the formation of LC3-II in Sh*HIF1A* cells, suggesting that HIF1A is not required for LC3 lipidation. Because autophagy is a dynamic process, the only way to prove that autophagy is impaired is to analyze its flux. Therefore, we assayed the accumulation of LC3-II in cells pretreated with a combination of E64d and pepstatin lysosomal protease inhibitors. Inhibition of the autophagic flux in T84-Sh*CTR* cells resulted in an increase of LC3-II protein by 3.2 fold. Interestingly, when cells were further infected with bacteria the relative quantity of LC3-II is higher than the sum of bacteria plus inhibitor alone. On the contrary, we observed that treatment of T84-Sh*HIF1A* with E64d/pepstatin resulted in a weak 2 fold accumulation of LC3-II as compared to the 3 fold observed in control cells. This result supports the hypothesis of a default in the autophagic flux (reduction of autophagosome turnover?). Likewise, LC3-II formation in response to bacteria and lysosomal protease inhibitors is not additive, which further supported impairment in the autophagic flux. Taken together, these results demonstrate that bacteria induce autophagic flux in intestinal epithelial cells and highlight a role of HIF1A in this process.

Autophagy is a multistep process that induces the formation of very specific cellular structures characterized by their limiting membranes and their intracellular content (Klionsky et al., 2012). To determine which autophagy step is impaired in T84-Sh*HIF1A*, we carefully analyzed transmission electron microscopy images of T84-Sh*CTR* and T84-Sh*HIF1A*. In control cells, AIEC LF82 bacteria are present within vesicle containing partially degraded rough endoplasmic reticulum, characteristic of degradative autophagic vesicle (Figure 2A). Loss of bacterial membrane further confirmed the degradative nature of this vesicle. In cells silenced for HIF1A, healthy electron dense bacteria are compartmentalized in vesicles containing multi lamellar structures and morphologic intact cytoplasm, which suggests that bacteria stay within early autophagic vesicle.

Autophagy starts with the formation of LC3-II positive double-membrane autophagosome. Autophagosome further fuses with lysosome to form an autolysosome allowing degradation of their contents by lysosomal proteases. Single-membrane autolysosome stains positive for LC3-II and Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1). To gain insight into the role of HIF1A in the autophagic degradation of AIEC, we used immunofluorescence technics to characterize the nature of vesicle which contain bacteria. Control or cells silenced for HIF1A were infected with AIEC LF82-GFP bacteria and 4

hours post infection, cells were fixed and stained with LC3-II and LAMP-1. As shown in Figure 2C, 63% of AIEC co-localized with LC3-II and LAMP-1 vesicles in control cells and only 9% of the bacteria co-stained with LC3-II alone. In contrast, in *ShHIF1A* cells the majority of the bacteria (43%) co-localized within LC3-II positive vesicles and only 12% of the bacteria were present in double stained (LC3-II and LAMP-1) vesicles. This result indicates that in absence of HIF1A, bacteria stay within autophagosome and therefore suggests that HIF1A is a key regulator of the autolysosome maturation.

The autophagosome sequentially matures to autolysosome via fusion with endocytic early endosome, tagged with early endosome antigen 1 (EEA-1) and then late endosome. We therefore questioned which step in the fusion process was impacted by loss of HIF1A. For that purpose infected cells were stained with early endosome antigen 1 (EEA-1) and LC3-II (Figure 3A). In control cells 45 % of LF82-GFP bacteria were co-localized with EEA-1 and LC3-II, this value does not reach more than 30% in HIF1A-silenced cells. More importantly, we observed in *ShHIF1A* cells that most bacteria (56%) remain in LC3-II positive vesicles whereas they seem to transit through LC3-II positive vesicles in control cells. To address more precisely this difference, we further performed a time course analysis over a period of four hours post infection (Figure 3B). Interestingly enough, in both cell lines the number of vesicles positive for EEA-1 and LC3-II increased during the first two hours to then slowly declines. Despite a difference in the number of bacteria within vesicles (20% in control cells and 10% in HIF1A silenced cells), the two curves have exactly the same profile, suggesting that maturation of autophagosomes to endocytic early endosomes is independent of HIF1A. In contrast, and as expected, most of the bacteria leaved LC3-II positive vesicles during the four hours' time course in control cells, whereas they remained associated to LC3-II vesicles in *ShHIF1A* cells. Taken together, this result brings new evidence to the role of HIF1A in the autolysosome maturation.

### **Xenophagy is impaired in T84-*ShHIF1A* cells**

Autophagy is a general cellular process that can be induced by different stimuli and each stimulus can induce a different type of autophagy (Klionsky et al., 2012). We then questioned which type of autophagy is impaired by HIF1A. First, we have submitted cells to a nutrient starvation stress. As shown in Figure 4A, 30 min in HBSS triggers a decrease in the



level of LC3-II in both control and HIF1A-silenced T84 cells. Such a decrease is transient; indeed LC3-II levels re-augment at one hour which suggests that longer nutrient stress induces new LC3 synthesis. Therefore, we concluded that the autophagic flux is normally induced by nutrient starvation in cells silenced for HIF1A.

We further characterized mitophagy. Mitophagy is a highly specific type of macroautophagy, allowing degradation of old and damaged mitochondria (Mazure et al., 2011). Under hypoxia, HIF1A has been shown to control mitophagy (Zhang et al., 2008), we therefore verified that T84ShHIF1A cells were defective in mitophagy when submitted to 18 hours hypoxia. For that purpose hypoxic cells were incubated with mitotracker. As expected, in control cells mitochondria are degraded under hypoxia whereas mitotracker staining was unchanged in cells silenced for HIF1A either in normoxia or hypoxia (Figure 4B). Finally, we brought evidence suggesting that the endocytosis pathway is not impaired in cells silenced for HIF1A. For that purpose we first studied the internalization of TRIC dextran (Figure S4). In both cell lines, exposition to 30 min TRIC dextran shows light dextran labeling at the periphery of the cells. By 60 min, dextran accumulations are detectable in a more intracellular position indicating that internalization of dextran is independent of HIF1A threshold level. Further, we studied EGF receptor (EGFR) endocytosis. Upon EGF stimulation, active receptor-ligand complexes are internalized and transported by multi-vesicular vesicles to lysosomes where they are degraded (Lai et al., 1989). The relative quantity of EGFR was assessed by immunoblotting total protein extracts with anti EGFR antibody. As shown in Figure S5, EGFR levels were decreased by approximately 50% in both cell lines after 120 min of EGF challenge. Taken together, these results highlight a role for HIF1A in xenophagy, the specific autophagy involved in AIEC degradation.

As a transcription factor, HIF1A regulates many genes. To investigate which of these genes may be responsible for autolysosome maturation, AIEC-infected control and HIF1A-silenced cells were profiled using pangenomic microarrays. As a quality control we first verified that HIF1A and well-known HIF1A-dependent genes (such as vascular endothelial growth factor A (VEGFA), carbonic anhydrase 9 (CA9) and BNIP3L (Brahimi-Horn et al., 2007)), were down-regulated in HIF1A silenced cells (Figure 5A). Further, among down-regulated genes, we have focused our attention on those related to vesicle transport and lysosomal activity and we have selected five potential candidates namely, the guanine

nucleotide exchange factors VAV2 and VAV3, lysosomal proteases, cathepsin L1 and L2 and V-ATPase subunits V1H and V1E (Figure 5A). Moreover, as shown in Figure 5B, we have confirmed by quantitative PCR that the level of mRNA expression is decreased in HIF1A silenced cells. Further, and in agreement with a loss of V-ATPase mRNA expression level, we observed that cells silenced for HIF1A presented a default in lysosomal activity as evidence by a decrease in the lysotracker staining (Figure S6).

## **Materials and Methods**

### **Cell culture**

The human colon carcinoma cell line T84 was supplied by ATCC (number CCL-248). Cells were cultured at 37°C in controlled atmosphere (5% CO<sub>2</sub> and 95% air) with Dubelcco Modified Eagle's Minimal Essential F12 (DMEM/F12) medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum FCS without antibiotics. Prior to infection, cells were starved overnight in DMEM/F12 containing Insulin-Transferin-Selenium (ITS, 100µg/ml) then washed twice with PBS and incubated 30 min in 1ml of fresh DMEM/F12 + ITS

### **Lentiviral infection**

T84 cells were transduced in polybrene (8 µgxml-1) with lentiviral particles containing Sh RNA-CTR, shRNA-HIF1A, shRNA-ATG5 and shRNA-SQSTM1 from Sigma-Aldrich human (SHC002V, TRCN0000003810, TRCN0000151963, TRCN0000007237 respectively) at a multiplicity of infection of three according to the manufacturer's protocol. Clones were maintained in puromycin (100 µgxml-1), which was removed 2 days before the experiment to get rid of the effect on bacterial infection.

### **Bacterial Strains**

The AIEC strain LF82 was isolated from a chronic ileal lesion of a patient with Crohn's disease (Darfeuille-Michaud et al., 1998). Bacteria were grown overnight at 37°C on LB-agar plates and expanded in LB medium at 37°C without shaking. Prior to experiments, bacteria were diluted 1 to 10 in fresh LB medium and culture 2 h at 37°C. Bacteria in growing exponential phase were then washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in fresh PBS and quantified by OD measurement ( $1.0 \text{ OD}_{600} = 2 \times 10^9 \text{ CFUxml}^{-1}$ ).

### **Survival assay**

Three  $10^5$  cells were plated in a 12 well plates at day 0 in growing medium. At day one, cells were incubated O/N in DMEM/F12. At day 2, prior the infection cells were rinsed once in PBS and incubated for two hours with 1ml of DMEM/F12 medium. Cells were then infected with AIEC LF82 strain at a multiplicity of infection (MOI) of 10. The bacterial survival within

epithelial cells was measured as protection against gentamicin, as described in (Bringer et al., 2006). Briefly, for each condition, cells were plated in triplicate in order to calculate the ratio of intracellular bacteria over a 1-h and 4-h period and bacterial replication was expressed as the mean percentage of bacteria recovered at 4 h post-infection relative to the number of bacteria recovered after 1 h of Gm treatment, defined as 100%. All infections were performed in duplicate, and each experiment was repeated at least 3 times.

### **Western blotting**

Eight  $10^5$  cells were plated in a 12 well plates at day 0 in growing medium. At day one, cells were incubated O/N in DMEM/F12 containing ITS. At day 2, prior the infection cells were rinsed once in PBS and incubated for two hours with 1ml of DMEM/F12 ITS medium. Cells were then treated as indicated in the figure legend, washed twice with ice-cold PBS and lysed in SDS sample buffer. Protein extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore). Prior to incubation with antibodies, membranes were saturated for 30 min in 5% non-fat milk diluted in tris buffer saline (TBS). Membranes were incubated overnight in the same buffer containing the indicated antibody, washed in TBS supplemented with 0.1% Triton X-100 three times. Membranes were then incubated with the secondary anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated antibody. Bound antibodies were revealed using an ECL system (Santa Cruz Biotechnology). When signals were quantified we used dye light secondary antibodies (anti-rabbit IRDye-800 or anti-mouse IRDye-680, Cell Signaling) and signal was acquired using an infrared imaging system (LI-COR Biosciences) as described by the manufacturer. Each experiment was repeated at least 3 times.

### **Immunofluorescence**

$2 \times 10^4$  T84 cells were seeded on glass coverslips and grown to 20% confluency and cells were processed as for western blotting experiments. After the indicated infection time, cells were washed 3 times with PBS, fixed with 3% paraformaldehyde, blocked with PBS containing 3% BSA and incubated with specific antibodies as indicated in the analysis of autophagy section. Secondary anti mouse Alexa-488 and secondary anti rabbit Alexa-633 conjugated antibodies were used. Coverslips were mounted in Prolong Gold antifade reagent with the nuclei dye

DAPI (Invitrogen) and visualized with a Zeiss Axiophot confocal fluorescence microscope. For quantification, 100 GFP-LF82 bacteria, on three different images, were counted and assayed for their co-localization with LC3-II, LAMP-1 and EEA-1. Each experiment was repeated at least 3 times.

### **Analysis of Autophagy**

We used immunoblotting, transmission electron microscopy (TEM) and confocal microscopy to study the consequences of AIEC infection on autophagy in T84 cells. First, we studied the autophagic flux. For that purpose control or infected cells were incubated with specific lysosomal protease inhibitors (Pepstatin A and E64d, 10µg/mL, Sigma) in presence or absence of AIEC and the levels of the autophagosome-associated LC3-II protein (Nanotools, clone 5F10, dil. 1/1000, which preferentially recognizes LC3-II) was analysed by immunoblotting. Then, we used transmission electron microscopy (TEM), confocal microscopy and immunoblotting to study the consequences of AIEC infection on autophagy in T84 cells. The formation of autophagic vesicles was analysed at the ultrastructural level using a Jeol EXII transmission electron microscope. T84 cells were infected for the indicated time and fixed with ice-cold 3% glutaraldehyde in 0.1 M Na cacodylate, pH 7.4 for 2 h. Cells were fixed in 10% buffered formalin, then processed, oriented on edge, embedded in paraffin, cut into sequential 4 µm sections, and stained by H&E and Giemsa for the evaluation of AIEC infection. To confirm the activation of autophagy we studied the formation of autophagolysosome by indirect immunofluorescence staining and confocal microscopy. In particular, the subcellular distribution of LC3-II, a specific marker of autophagosomes, (1/500, mouse, clone 5F10, Nanotools) LAMP-1, the lysosome-associated membrane protein-1, (1/500, goat, Santa Cruz biotechnology) and EEA-1, the Early Endosome Antigen 1 (1/500, rabbit, Abcam), protein a specific marker of early endosome were analyzed.

Nutrient stress-induced autophagy was studied on cells incubated in HBSS for the indicated times and levels of LC3-II was analyzed by immunoblot experiment. To assess mitophagy (the specific autophagic degradation of mitochondria), cells were incubated with mitotracker, a specific marker of mitochondria (Mito Tracker Red FM, Life Technologies, 1 to 20000) for 20 min and images from lived cells were acquired using EVOS *fl* microscope (AMG).

### **RNA extraction and relative and absolute real-time quantitative PCR**

Confluent cells seeded in 6-well plates were treated as indicated in the figure legend, lysed in Trizol reagent (Invitrogen) and total RNA was prepared according to the manufacturer's protocol. One microgram of total RNA was reversed transcribed in a 20 µl reaction according to the manufacturer's instruction (high capacity DNA RT kit, Applied). Real-time amplification (q-PCR) was performed on a Step One real time PCR system using cDNA and specific primers (see supplementary table 1) as indicated by the supplier (Applied, Power Sybr Green PCR mix). For quantification we used the  $2^{-DDC(T)}$  method. According to this method, the C(T) values for the expression of each transcript in each sample were normalized to the C(T) values of the control mRNA of the same sample. The values of T84-ShCTR cell samples were then set to 1 and the fold increase was calculated.

### **pangenomic microarrays**

The integrity of total RNAs was evaluated using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent Technologies) was used to prepare Cy3-labelled target cRNA according to the manufacturer's instructions. Labeled cRNAs were hybridized with a SurePrint G3 Human GE 8×60K Microarrays (Agilent Technologies). Two biological replicate hybridizations were performed. Array images were captured using a DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies), and data were analyzed using Feature Extraction Software (Agilent Technologies) to obtain background-corrected signal intensities. The statistical analysis of the microarray data has been performed in R [1], using the limma [2] package. We applied a between-array normalization using the quantile method. Differentially expressed genes between conditions were selected based on the moderated t-statistic and a Benjamini-Hochberg correction of the p-value for multiple tests supplied by the limma[2] package.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using a one-tailed Mann Whitney test. P value less than 0.05 were considered statistically significant.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank Sophie Pagnotta and Mireille Mari for their expertise in transmission electron microscopy. Franck Lafont, Mireille Cormont and Sandrine Lacas-Gervais are acknowledged for helpful discussions and Arlette Darfeuille-Michaud for AIEC LF82 bacteria. This work was supported by grants from “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale”, the “Association pour la Recherche contre le Cancer” (ARC Grants no SL220110603478) and the “Centre National de la Recherche Scientifique ». The authors declare no conflicting financial interests.

## References

- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R.H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S.G., *et al.* (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J* 1, 403-418.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 29, 2570-2581.
- Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)* 85, 1301-1307.
- Brest, P., Corcelle, E.A., Cesaro, A., Chargui, A., Belaid, A., Klionsky, D.J., Vouret-Craviari, V., Hebuterne, X., Hofman, P., and Mograbi, B. (2010). Autophagy and Crohn's disease: at the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer. *Curr Mol Med* 10, 486-502.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.F., Hebuterne, X., *et al.* (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 43, 242-245.
- Bringer, M.A., Glasser, A.L., Tung, C.H., Meresse, S., and Darfeuille-Michaud, A. (2006). The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol* 8, 471-484.
- Cane, G., Ginouves, A., Marchetti, S., Busca, R., Pouyssegur, J., Berra, E., Hofman, P., and Vouret-Craviari, V. (2010). HIF-1 $\alpha$  mediates the induction of IL-8 and VEGF expression on infection with Afa/Dr diffusely adhering *E. coli* and promotes EMT-like behaviour. *Cell Microbiol* 12, 640-653.
- Chargui, A., Cesaro, A., Mimouna, S., Fareh, M., Brest, P., Naquet, P., Darfeuille-Michaud, A., Hebuterne, X., Mograbi, B., Vouret-Craviari, V., *et al.* (2012). Subversion of Autophagy in Adherent Invasive *Escherichia coli*-Infected Neutrophils Induces Inflammation and Cell Death. *PLoS One* 7, e51727.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405-1413.
- Frede, S., Berchner-Pfannschmidt, U., and Fandrey, J. (2007). Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Methods Enzymol* 435, 405-419.
- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., *et al.* (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544.
- Kuballa, P., Huett, A., Rioux, J.D., Daly, M.J., and Xavier, R.J. (2008). Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One* 3, e3391.
- Lai, W.H., Cameron, P.H., Wada, I., Doherty, J.J., 2nd, Kay, D.G., Posner, B.I., and Bergeron, J.J. (1989). Ligand-mediated internalization, recycling, and downregulation of the epidermal growth factor receptor in vivo. *J Cell Biol* 109, 2741-2749.



- Lapaquette, P., Bringer, M.A., and Darfeuille-Michaud, A. (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol* 14, 791-807.
- Lapaquette, P., Glasser, A.L., Huett, A., Xavier, R.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 12, 99-113.
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120, 159-162.
- Levine, B., and Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7, 767-777.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.
- Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2011). Hypoxic mitochondria: accomplices in resistance. *Bull Cancer* 98, 40-46.
- Mimouna, S., Goncalves, D., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., Hofman, P., and Vouret-Craviari, V. (2011). Crohn disease-associated *Escherichia coli* promote gastrointestinal inflammatory disorders by activation of HIF-dependent responses. *Gut Microbes* 2.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Pujol, C., Klein, K.A., Romanov, G.A., Palmer, L.E., Cirota, C., Zhao, Z., and Bliska, J.B. (2009). *Yersinia pestis* can reside in autophagosomes and avoid xenophagy in murine macrophages by preventing vacuole acidification. *Infect Immun* 77, 2251-2261.
- Richard, D.E., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275, 26765-26771.
- Semenza, G.L. (2011). Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 365, 537-547.
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 283, 10892-10903.

## Figure legends

### Figure 1 : Survival of AIEC is increased in cells silenced for HIF1A

A. The survival of bacteria was measured by the gentamicin protection assay. After 2 h of infection (10 MOI), intestinal epithelial T84-ShCTR, -ShHIF1A, ShSQSTM1 and ShATG5 cells were incubated with gentamicin (100 µg/ml) for 1 and 5 h. Cells were washed with PBS and lysed with PBS 1% Triton X-100. The colony forming units were determined on LB agar plates and AIEC survival was expressed as indicated in Materials and Methods section. The data are representative of 4 independent experiments.

B. Representative electron micrographs of T84-ShCTR, T84-ShHIF1A, T84-ShATG5 and T84-ShSQSTM1 cells infected with AIEC LF82 (MOI of 10) 16 h in presence of gentamycin. Arrows denoted degraded bacteria in autolysosome (1), healthy bacteria in vesicles containing cytosolic material (2), healthy bacteria free in the cytosol (3) and healthy bacteria within single-membrane vesicle (4).

### Figure 2: Inhibition of autophagic flux in cells silenced for HIF1A

Control and HIF1A silenced T84 cells were infected with AIEC LF82 at a MOI of 10 for 2 h then gentamicin (100 µg/ml) was added for 4 h. Cells were processed for immunoblotting (A), ultrastructural TEM analysis (B) and immunofluorescence (C).

A. Autophagic flux was analysed by immunoblot analysis with LC3-II antibody in cells infected for 6 h (2 + 4) with AIEC LF82 bacteria (MOI 10) in the absence or in the presence of E64d/peps. Actin was used as a loading control. Results from 4 independent experiments were quantified as described in Materials and Methods; the values of non-treated T84-ShCTR and ShHIF1A cell samples were then set to 1 and the fold increase was calculated.

B. Representative electron micrographs of T84-ShCTR and T84-ShHIF1A cells infected with AIEC LF82 (MOI of 10) 16 h in presence of gentamycin. Arrows denoted degraded bacteria characterized by loss of bacterial membrane and regular round shape (1), vesicle containing partially degraded rough endoplasmic reticulum (2), intact healthy bacteria (3) and intact cytoplasm (4).

C. Representative confocal microscopy examinations of GFP-LF82 infected ShCTR and ShHIF1A cells stained with anti-LC3-II (red, marker of autophagy vesicles) and anti- LAMP-1

(blue, marker of mature lysosomes) antibodies showing that LF82 bacteria remained within LC3-II positive vesicles in cells invalidated for HIF1A. Quantification was performed as described in the Materials and Methods section. Results from 3 independent experiments are shown. \*\*  $p < 0.05$  as compared to T84-ShCTR cells in the same condition.

**Figure 3:** HIF1A is not necessary for early endocytosis vesicle trafficking

Control and HIF1A silenced T84 cells were infected with AIEC LF82-GFP bacteria at a MOI of 10 for 2 h then gentamicin (100 $\mu$ g/ml) was added for 4 h and cells were processed for immunofluorescence as described in the Materials and Methods.

A. Representative confocal microscopy examinations of GFP-LF82-infected ShCTR and ShHIF1A cells stained with anti-LC3-II (red, marker of autophagy vesicles) and anti-EEA-1 (blue, marker of early endosome) antibodies suggesting that LF82 bacteria are not retained within EEA-1 positive vesicles in both cell lines. Results from 3 independent experiments are shown. \*\*  $p < 0.05$  as compared to T84-ShCTR cells in the same condition.

B. Time course of co-localization of LF82-GFP bacteria within early endocytosis vesicles. Control (full square) and HIF1A silenced (empty square) cells were infected for 2 h with 10 MOI GFP-tagged LF82 bacteria and treated with Gentamycin for the indicated time. After infection cells were fixed and stained with EEA-1 and LC3-II antibodies. For each condition 100 bacteria were counted in order to investigate their localization. The data are representative of 2 independent experiments.

**Figure 4:** HIF1A does not impaired autophagy

A. Nutrient stress-induced autophagy was characterized by immunoblot analysis with LC3-II antibody of cellular lysates from T84-ShCTR and T84-ShHIF1A incubated in HBSS for 0, 30 and 60 min, then lysed and subjected to sonication. The time course analysis indicates that the autophagic flux is functional in both cell lines. The data are representative of three independent experiments.

B. Mitophagy was assessed in T84-ShCTR and T84-ShHIF1A cells using a red mitotracker. Representative microscopy images show almost no mitochondria under hypoxia in control

cells. By contrast, and as expected for a HIF1A-dependent response, mitochondria were stained by mitotracker in HIF1A-silenced cells under normoxia and hypoxia.

**Figure 5:** Pangenomic microarray to profile HIF1A-induced xenophagic genes

A. A microarray analysis reveals genes from the HIF, phagocytosis and lysosome GSEA projection as a transcriptional target of HIF1A. Control and HIF1A silenced cells were infected with AIEC LF82 bacteria for a 4h-period and total RNA was extracted. The samples were then co-hybridized to a pan genomic microarray. VAV2, CTSL2, CTSL1, ATP6V1H and ATP6V1E down expressions were detected by microarray. Hybridizations were performed in duplicate.

B. Quantification of the selected gene mRNA levels was measured by RT-PCR in AIEC LF82-infected T84-ShCTR and ShHIF1A cells. Excepted for CTSL1, the inhibition of mRNA levels was confirmed for all the selected genes. Results shown are representative of two separate experiments made in duplicate.

Figure 1

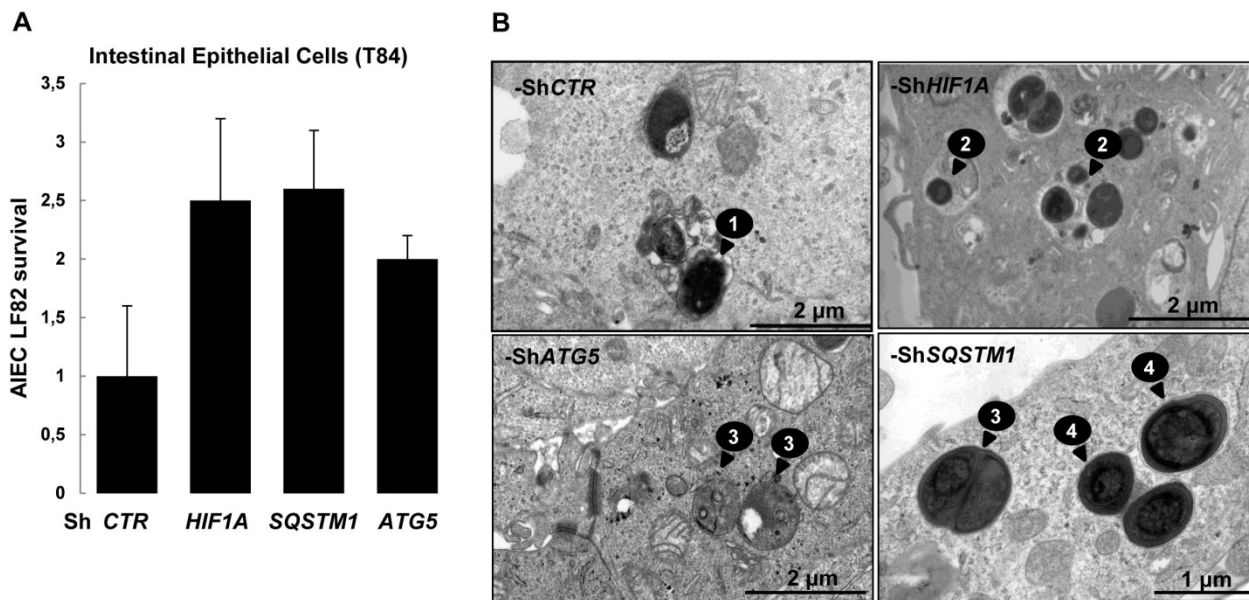


Figure 2

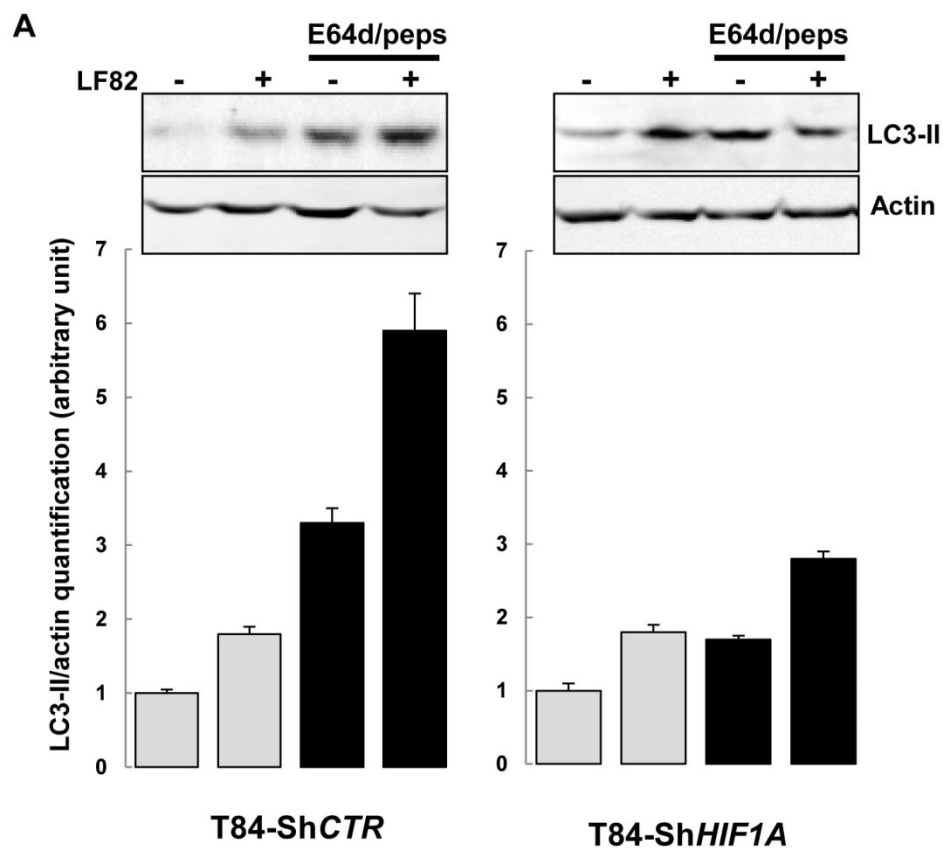


Figure 2

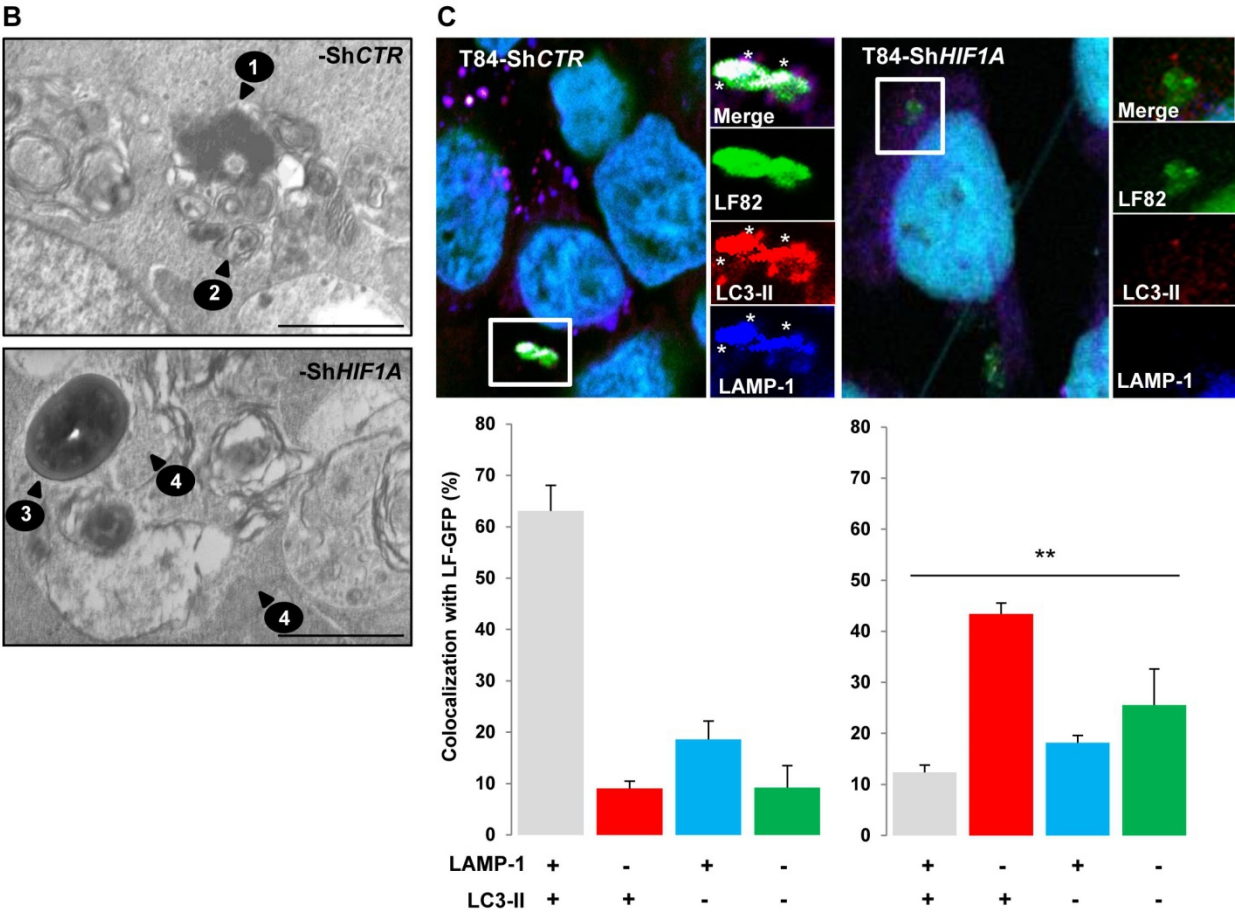


Figure 3

A

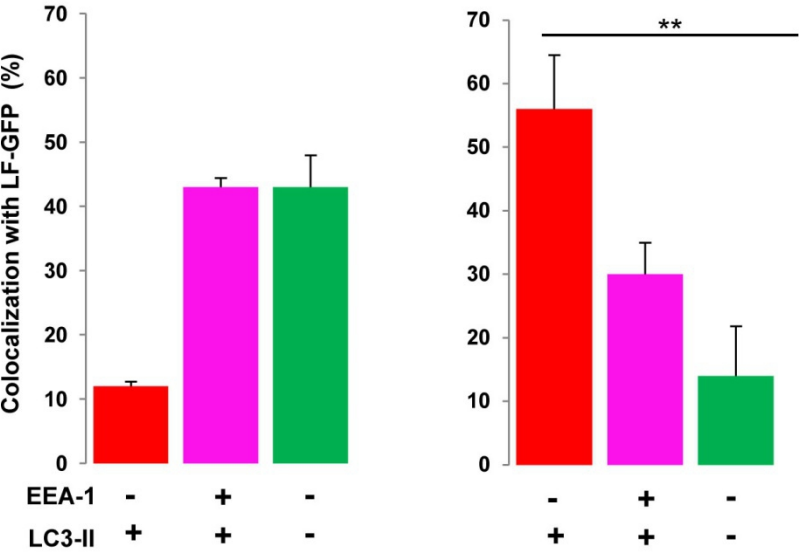
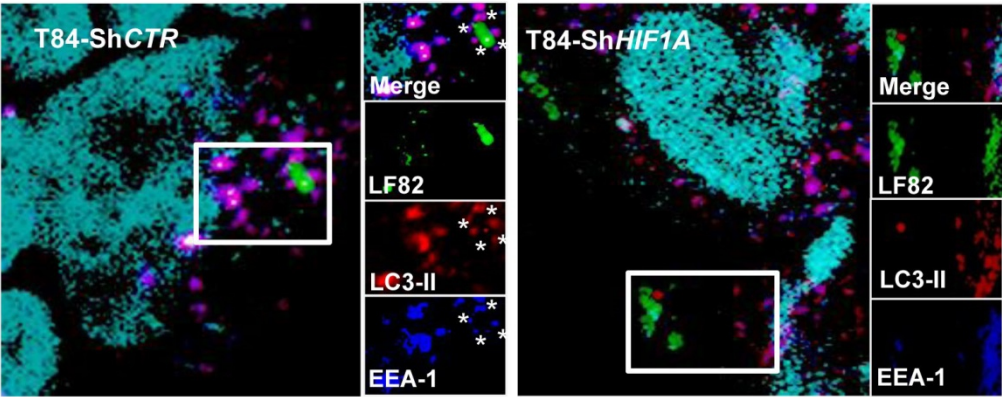


Figure 3

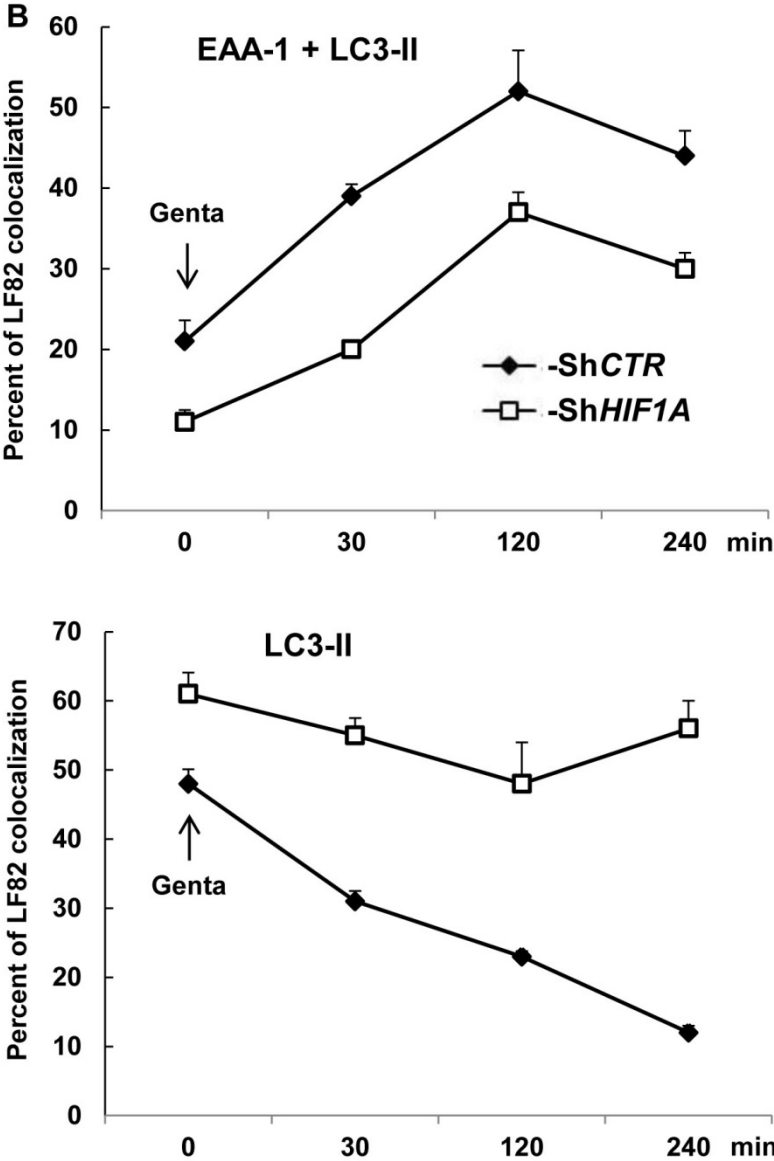




Figure 4

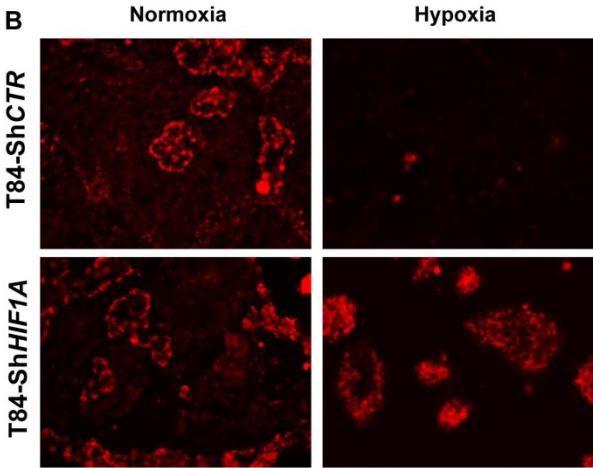
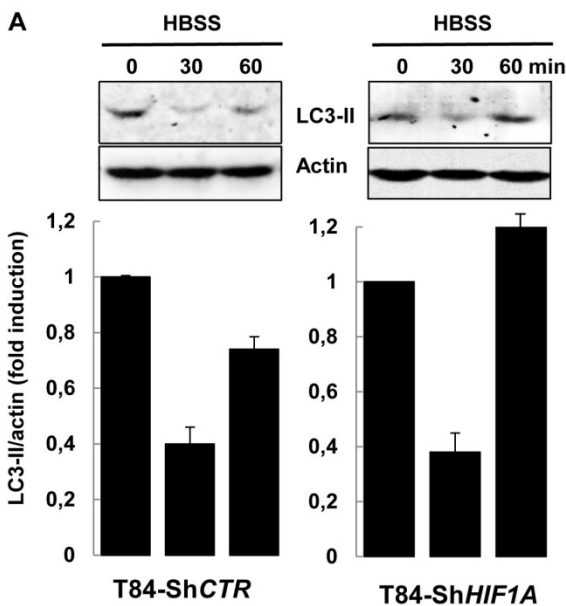
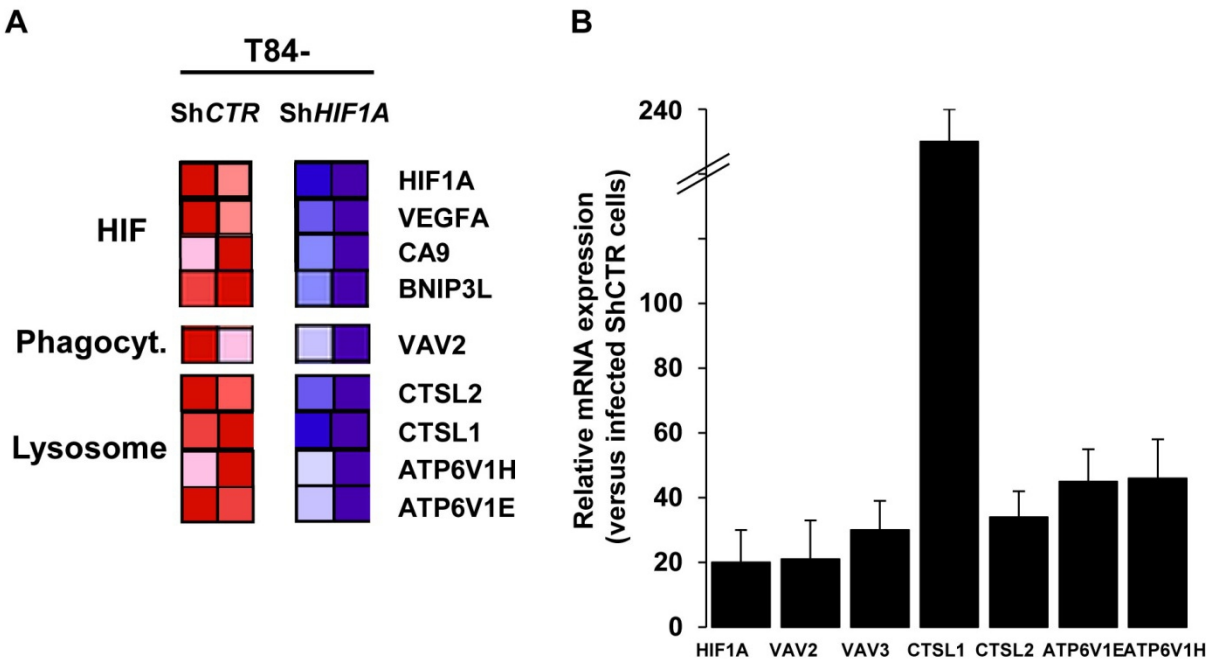
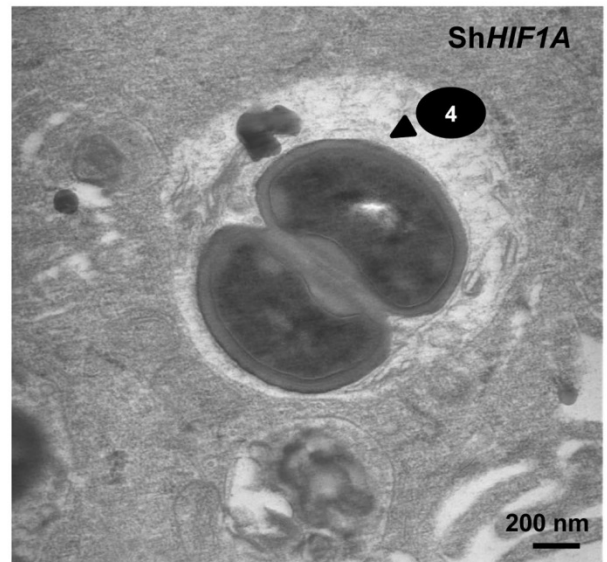
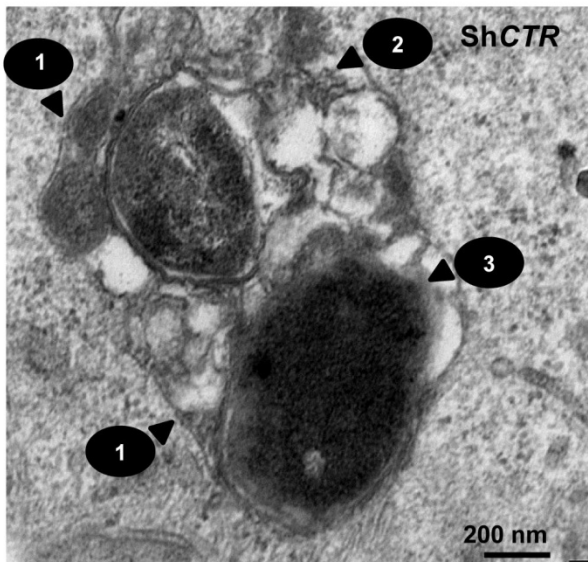


Figure 5



### S1: Localization of LF82 bacteria within intracellular vesicles

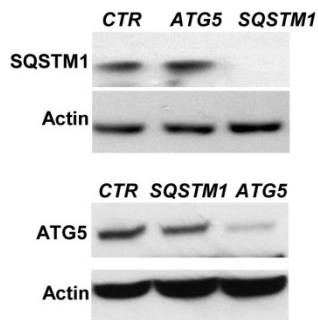


#### Supplementary data S1

Representative electron micrographs of T84-ShCTR and T84-ShHIF1A cells infected with AIEC LF82 (MOI of 10) 16 h in presence of gentamycin. Arrows denoted double-membrane characteristic of autophagosome (1), partially degraded rough endoplasmic reticulum (2), degraded bacteria characterized by their loss of bacterial membrane and regular round shape (3), and dividing healthy bacteria in vesicles containing cytosolic material (4).

## S2: T84-ShSQSTM1 and -ShATG5 characterization

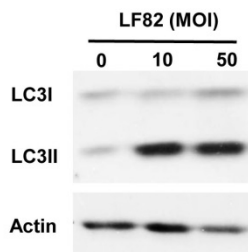
### T84-Sh



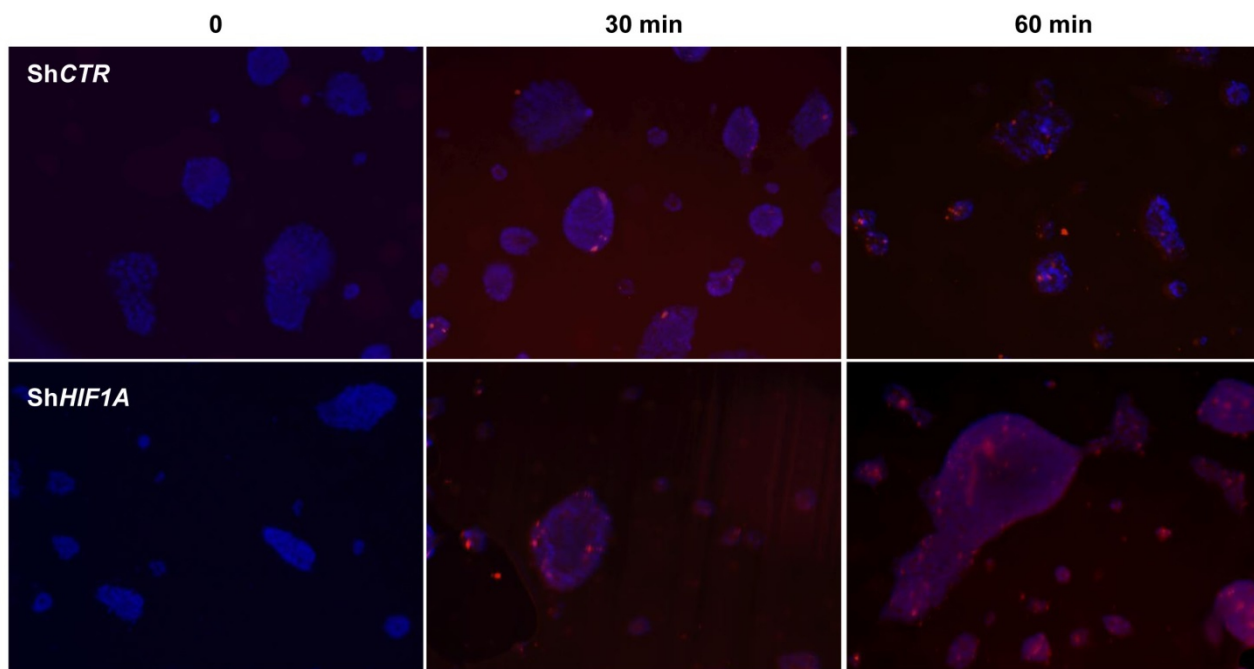
### Supplementary data S2

Protein extracts from indicated cells were analyzed by western blot experiments using either SQSTM1 (p62) and ATG5 antibodies.

## S3: LC3-II expression in response to increasing doses of AIEC LF82 bacteria in T84-ShCTR cells



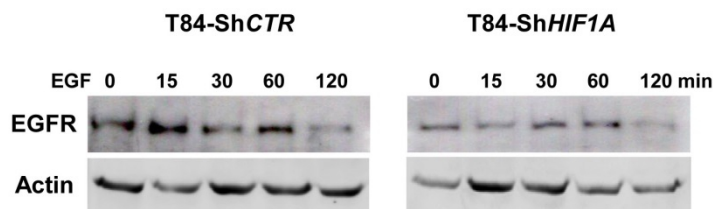
#### S4: Endocytosis pathway is not impaired in HIF1A silenced T84 cells



#### Supplementary data S4

Representative images of T84-ShCTR and -ShHIF1A cells incubated with TRIC dextran for 30 and 60 minutes. In both cell lines, red dots, corresponding to TRIC dextran, stick to cells after 30 minutes. At one hour, the number and the size of the red dots increased suggesting that loss of HIF1A does not impaired dextran endocytosis.

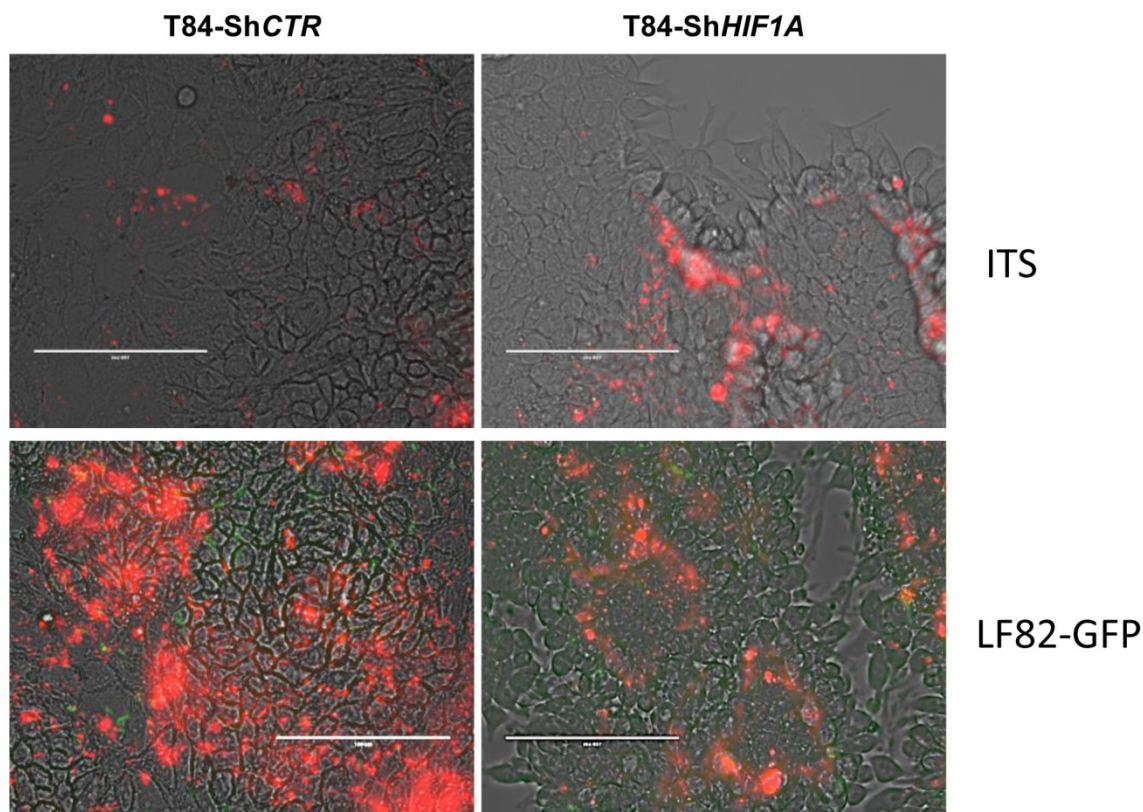
### S5: EGF receptor Endocytosis is not impaired in HIF1A silenced T84 cells



#### Supplementary data S5

The time course of EGFR internalization/degradation shows no difference between T84-ShCTR and –ShHIF1A cells. To prevent EGF-induced EGFR synthesis, cells were pre-incubated with cycloheximide prior to stimulation with EGF. Cells were incubated with EGF up to two hours and total cell extracts were analyzed by immunoblotting with anti EGFR antibodies. The total actin level was monitored as a control for equal protein loading.

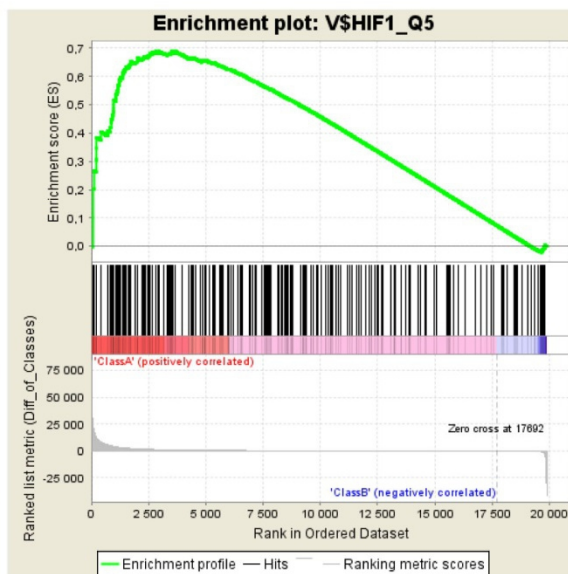
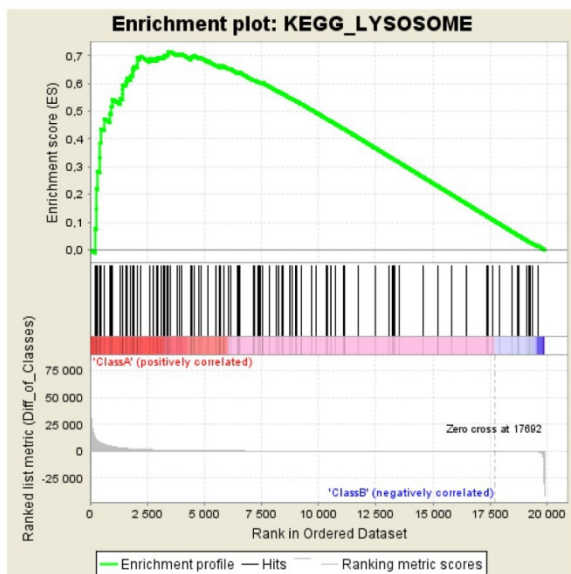
### S6: EGF receptor Endocytosis is not impaired in HIF1A silenced T84 cells



#### Supplementary data S6

Representative direct microscopy examinations of ShCTR and ShHIF1A cells infected with LF82-GFP bacteria for a 6h-period (2 + 4) and incubated with lysotracker the last 15 min. In control cells bacteria induced lysosomal activity as denoted by an increase in the red staining. In contrast, in cells silenced for HIF1A we observed less staining indicating a default in the lysosomal activity.

## S7: GSEA projection analysis plot



## DISCUSSION PAPIER 2

Le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans la mise en place d'une réponse autophagique en hypoxie est bien caractérisé [<sup>160</sup>]. Nos travaux ont mis en évidence que les bactéries AIEC LF82 induisent une augmentation d'expression de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules intestinales épithéliales en culture mais aussi dans les cellules intestinales de souris compétentes pour l'infection par les AIEC LF82 [<sup>259</sup>]. Les AIEC sont des bactéries isolées de patients MICI qui sont capables de survivre dans des cellules épithéliales intestinales [<sup>257</sup>]. La xénophagie étant un type d'autophagie spécialisée dans la dégradation des bactéries intracellulaires, nous avons étudié le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans ce processus.

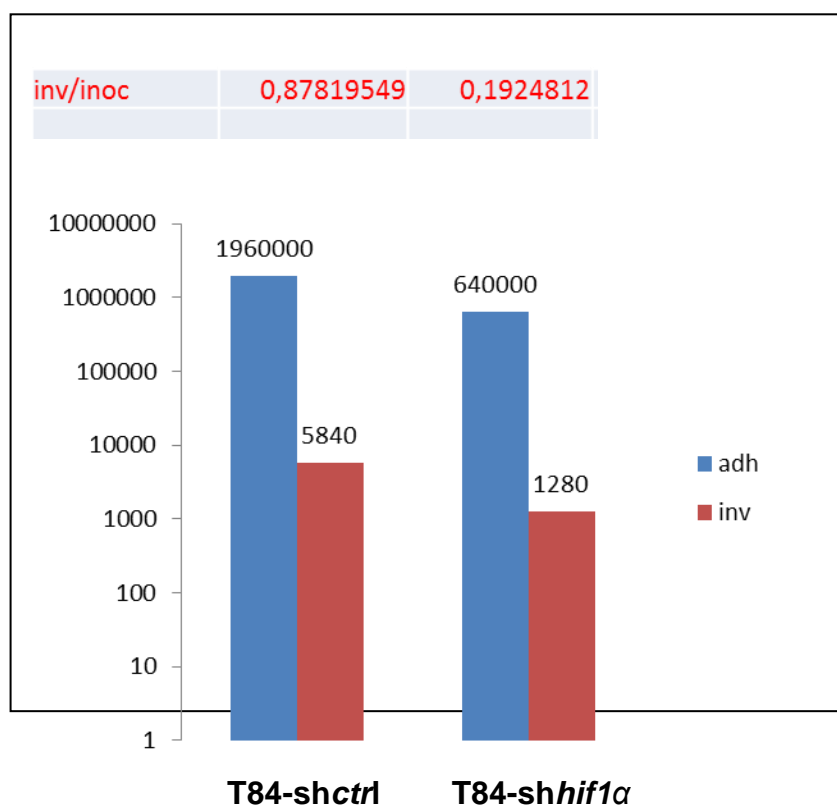
Nous avons démontré que les AIEC LF82 survivent mieux dans des cellules invalidées pour l'expression de la protéine HIF-1 $\alpha$  et que cette survie est comparable à celle observée dans des cellules ayant un défaut autophagique (T84-*shatg5* et T84-*shp62*). Les images de microscopie électronique nous ont permis d'observer que les bactéries qui survivent dans les cellules T84-*sh-hif-1 $\alpha$*  sont contenues dans des structures multi lamellaires généralement associées à l'autophagie. Nous avons donc par la suite caractérisé le flux autophagique dans les cellules invalidées pour HIF-1 $\alpha$  et comparé ce flux à celui observé dans les cellules contrôles. Les résultats démontrent que le flux autophagique est bloqué, vraisemblablement dans une étape tardive du processus au vu des images de microscopie électronique.

Les images de ME montrent clairement (Figure 2A) que les AIEC LF82 contenues dans les cellules T84-*sh-hif-1 $\alpha$*  ne sont pas dégradées, leur membrane bactérienne est intacte alors qu'elle n'est pratiquement plus visible dans les cellules T84-*shctrl*. Afin de déterminer précisément la nature des structures multi lamellaires observées dans les cellules HIF-1 $\alpha$  déficientes nous avons réalisé un double marquage LC3-II/LAMP-1 (caractéristique des autophagolysosomes) des cellules infectées par une souche fluorescente de LF82, les AIEC



LF82-GFP. Alors que les AIEC LF82-GFP sont localisées dans des autophagolysosomes après 4 heures d'infection dans les cellules contrôles, elles restent fortement associées à des vésicules marquées uniquement par LC3-II dans ces cellules T84-*Shhif1α*.

Nous avons par la suite tenté de déterminer si le blocage du flux n'avait pas lieu plus tôt dans le processus xénophagique. Dans ce but, nous avons regardé la localisation des AIEC LF82-GFP avec un couple de marqueur LC3-II/EEA-1 cette fois-ci pour marquer les endosomes précoces. Nous avons observé que les bactéries transitent par les endosomes précoces de la même manière dans les cellules contrôles et les cellules invalidés pour HIF-1 $\alpha$ . Il existe néanmoins une différence dans le pourcentage de bactéries associées aux endosomes précoces. Nous pensons que cette différence est la conséquence d'une adhérence bactérienne légèrement diminuée dans les cellules T84-*Shhif1α*. Quoiqu'il en soit, une fois que les bactéries adhèrent aux cellules elles sont capables de les envahir ; néanmoins, les facteurs bactériens ainsi que les récepteurs cellulaires impliqués dans l'invasion n'ont pas encore été complètement caractérisés.





Ci-dessus, le nombre d'AIEC LF82 recensé dans chaque type cellulaire après un test d'invasion (décrit dans le matériel et méthode du papier 1) dans des cellules invalidées pour HIF-1 $\alpha$  comparée aux cellules contrôles. Les histogrammes bleus représentent le nombre de bactéries ayant adhéré aux cellules et les histogrammes en rouge, le nombre de bactéries ayant envahi les cellules. Le taux d'invasion est calculé au-dessus en fonction de l'inoculum initial. Des bactéries sont dites invasives, lorsque ce taux est égal à 0,1. On voit clairement ici que les bactéries envahissent beaucoup mieux les T84-shctrl.

Du fait que les bactéries intracellulaires sont prises en charge dans les endosomes précoces de façon équivalente dans les deux types de cellules, ceci suggère que le défaut de dégradation observé en absence de HIF-1 $\alpha$  est associé à un défaut de fusion avec les lysosomes. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé une persistance du signal LC3-II, (LC3-II étant aussi un substrat de l'autophagie, sa persistance est compatible avec un défaut de dégradation.

Ces résultats démontrent que HIF-1 $\alpha$  contrôle l'adressage des bactéries aux autophagolysosomes dans les cellules épithéliales intestinales. Cet effet de HIF-1 $\alpha$  est spécifique à la xénophagie car l'autophagie induite par HBSS n'est pas impactée.

L'entrée d'une bactérie dans une cellule infectée se fait de manière active en sécrétant des toxines leur permettant de moduler la surface cellulaire en faveur de leur invasion (comme *Shigella* et *Salmonella*) ou en se liant aux récepteurs cellulaires (comme *Mycobacterium* et *Listeria*) [<sup>263,264</sup>]. En fonction du mode d'entrée de ces bactéries différentes voies de signalisation intracellulaires sont induites [<sup>265</sup>]. Dans le cas de *Shigella flexneri* (une entérobactérie invasive), l'internalisation se fait par endocytose et formation d'une vacuole que la bactérie lyse une fois dans la cellule et manipule le cytosquelette d'actine intracellulaire pour échapper aux mécanismes de dégradation [<sup>266</sup>]. Dans le cas des AIEC, le

fait qu'elles soient prises en charge par des endosomes précoces ici et des phagosomes [260] laisse à penser qu'elles suivent la voie de l'endocytose. Le mode d'entrée de ces bactéries reste donc à caractériser.

De plus, et comme attendu, nous avons montré que les cellules déficientes pour l'expression de HIF-1 $\alpha$  sont incapables de dégrader les mitochondries.

Notre étude a ainsi mis en évidence un rôle inattendu du facteur hypoxique HIF-1 dans la dégradation des bactéries intracellulaires. Alors que le blocage du flux autophagique est une réponse cellulaire dans le cas des cellules épithéliales intestinales, nous avons observé un blocage de flux associé à une réponse bactérienne dans le cadre d'une infection d'une lignée de neutrophiles, les cellules PLB-985[171].

L'unité de dégradation des cellules est le lysosome. Il contient les enzymes et le pH acide nécessaire à leur fonction de dégradation. Les analyses de puces pangénomiques nous ont permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans l'activité lysosomale. L'action de CTSL2 (cathépsine) est décrite comme tissu spécifique et son expression varie en fonction du type cellulaire [267]. Quelques études décrivent sa fonction [268], mais aucune ne la relie à HIF-1 $\alpha$  ni à une régulation microbes dépendante.

Il en est de même pour les deux sous-unités ATP6V1H et ATP6V1E de la V-ATPase à protons nécessaire à l'acidification du lysosome.

Les protéines vav2 et vav3 sont des « Guanine nucleotide Exchange Factors » (GEFs) qui jouent un rôle promoteur dans la mise en place du cancer de la peau [269]. La mise en évidence d'une régulation par HIF-1 $\alpha$  de ces protéines permettra de mieux caractériser leur rôle dans les cellules épithéliales intestinales. Dans un contexte où HIF-1 $\alpha$  est augmenté comme c'est le cas au niveau des muqueuses de patients MICI, ces protéines pourraient faire partie des facteurs favorisant la mise en place d'un cancer colique.

## PERSPECTIVES PAPIER 2

En perspectives à courts termes de ce papier, il est impératif de vérifier si les gènes validés pour leur diminution en absence de HIF-1 $\alpha$  par qPCR, comportent des « Hypoxia Response Elements » (HRE). Ceci permettra de déterminer si leur régulation en réponse à HIF-1 $\alpha$  se fait de manière transcriptionnelle directe ou indirecte.

Nous avons déjà commencé des westerns blot pour vérifier l'expression des protéines CTSL2, ATP6V1H, ATP6V1 E, vav2 et vav3. Ceci nous permettra de conforter la régulation directe ou indirecte de HIF-1 $\alpha$  sur ces gènes.

Il s'agira ensuite, de caractériser les voies de signalisation induite par les AIEC et qui régulerait l'effet de HIF-1 $\alpha$  sur ces gènes. On utilisera des inhibiteurs des récepteurs connus pour induire la xénophagie en réponse aux mutants bactériens qui permettront de discriminer l'implication de chacun des facteurs de virulences (flagelle, pili de type 1 ou peut être une toxine bactérienne pas encore identifiée) dans l'induction de la réponse xénophagique.

Par la suite, nous pourrons générer des lignées de cellules T84 invalidées pour l'expression de ces différents gènes identifiés et vérifier non seulement leur régulation par HIF-1 $\alpha$ , mais aussi en réponse aux bactéries. Ce afin de déterminer à quel niveau précis se fait le blocage du flux autophagique observé dans les cellules invalidées pour HIF-1 $\alpha$ .

A défaut de pouvoir tester nos résultats sur un modèle de souris répondant à l'infection par les AIEC, nous pourrions commencer par les reproduire dans une lignée de cellules épithéliales intestinales de souris « Mouse embryonic fibroblast » (MEF).

HIF-2 $\alpha$  étant exprimé au niveau de l'intestin des patients MICI, nous pourrions vérifier son expression en réponse aux AIEC afin de déterminer son implication ou pas dans la régulation du processus xénophagique.

Il reste aussi à déterminer l'implication des protéines adaptatrice (P62, NRB1, NDP52) dans le ciblage xénophagique des AIEC. Des expériences de Co localisation par

Immunofluorescence comme celles utilisées pour caractériser les vésicules contenant les bactéries sont à envisager.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La complexité des MICI vient du fait qu'elles résultent d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux qui, pris dans leur ensemble, perturbent l'homéostasie intestinale à différents niveaux : 1) la composition du microbiote, 2) l'étanchéité de la barrière intestinale, 3) la réponse inflammatoire et 4) la réponse aux infections. Globalement, les MICI sont caractérisées par une amplification de la réponse inflammatoire qui histologiquement se traduit par l'apparition de lésions au niveau de la muqueuse intestinale. Cette dérégulation est en partie la conséquence des mutations retrouvées sur les gènes impliqués dans le contrôle dans le contrôle de l'inflammation. Par exemple, parmi les gènes de susceptibilité identifiés par GWA chez des patients MICI, plusieurs jouent un rôle dans le maintien de la barrière intestinale. Cette dernière, protège les cellules de l'hôte d'une infection par des pathogènes présents dans le microbiote intestinal. De plus, le microbiote des patients MICI subit un phénomène de dysbiose en faveur des souches pathogènes chez les individus atteints [<sup>237</sup>; <sup>270</sup>; <sup>271</sup>; <sup>272</sup>; <sup>273</sup>; <sup>274</sup>; <sup>275</sup>; <sup>276</sup>].

Au niveau extracellulaire, l'altération de la réponse normalement efficace contre les microbes commence par la reconnaissance bactéries-cellules hôte, un événement essentiel à la mise en place de toutes les réponses de défense de l'hôte. En accord avec cela, des mutations sur les gènes de susceptibilité aux MICI ont aussi été identifiées sur des récepteurs membranaires de bactéries comme TLR4 [<sup>277</sup>] et CEACAM6 [<sup>278</sup>].

Au niveau intracellulaire, la prise en charge des composants bactériens se fait essentiellement via les protéines qui contrôlent des réponses immunitaires et autophagiques :

- immunitaire NOD2/CARD15 [<sup>279</sup>] (récepteur microbien intracellulaire) dont des variants, retrouvés chez les malades MC, sont incapables de prendre en charge les pathogènes intracellulaires.

- autophagiques ATG16L1 et IRGM [257] qui interviennent au même niveau que NOD2 et dont les variants mutés induisent un défaut autophagique au niveau des cellules épithéliales intestinales.

Toutes ces observations renforcent l'hypothèse de l'implication d'un facteur bactérien dans la pathogenèse des MICI.

Les *E.coli* entéropathogènes sont un petit groupe de *E. coli* ayant acquis des facteurs de virulences assez remarquables puisqu'ils sont capables de former des structures en piédestal par recrutement d'actine à la surface des cellules infectées [162]. Ces bactéries ont donc développé un moyen de détourner le cytosquelette d'actine des cellules hôte à leur propre bénéfice. C'est à une souche particulière de ce groupe de bactéries que nous nous sommes intéressés dans nos deux études. Les AIEC, des bactéries qui ont été isolées de patients MC, sont retrouvées en forte densité chez ces derniers et expriment des facteurs de pathogénicité particuliers leur permettant d'adhérer à la surface des cellules épithéliales intestinales dans un premier temps puis de les envahir [237,280,281,239; 249; 241; 242]. Ces bactéries sont en plus capables de survivre dans l'espace intracellulaire et de s'y multiplier [169; 170; 171].

L'objectif de mon travail de thèse a été dans un premier temps d'étudier l'implication de ces bactéries dans la pathogenèse des MICI. Alors que plusieurs études ont tenté de relier un pathogène en particulier au développement des MICI, sans preuves concluantes, notre étude apporte de nouveaux éléments qui confortent l'hypothèse d'un rôle des AIEC dans la pathogenèse de la MC. En effet, nous avons démontré une augmentation d'expression de la sous unité HIF-1 $\alpha$  dans les cellules intestinales épithéliales infectées par les AIEC.

Les facteurs de transcription HIFs régulent plusieurs réponses cellulaires. De ce fait, ils sont hautement régulés, régulation qui intervient au niveau des sous unités  $\alpha$  [102]. Les deux sous unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont décrites comme étant surexprimées au niveau de l'intestin, tissu reconnu pour son profil hypoxique [282]. Au cours de cette étude, nous nous sommes concentrés sur HIF-1 $\alpha$  car il avait été montré au laboratoire que l'expression de cette protéine

est augmentée dans les CEI infectées par des *E. coli* à adhérence diffuse, DAEC [134]. De plus, des études faites sur des cellules de rats suggèrent qu'il existe dans les tissus une expression inversement proportionnelle de ces deux facteurs [282]. Il serait néanmoins intéressant de vérifier si les AIEC induisent une augmentation d'expression de la protéine HIF-2 $\alpha$ , puisque cette dernière est impliquée dans l'homéostasie du fer [154] et que les bactéries sécrètent des sidérophores bactériens [133].

Notre étude a démontré qu'une inter régulation complexe se fait entre HIF-1 $\alpha$  et NF $\kappa$ B en réponse à l'infection par les AIEC LF82. D'un côté, en réponse aux AIEC, on observe une régulation « classique » de HIF-1 $\alpha$  par NF $\kappa$ B [283; 252; 253] qui se traduit par l'augmentation de VEGF et IL-8. D'un autre côté, nous avons été surpris d'observer un défaut de phosphorylation d'I $\kappa$ B indiquant un défaut d'activation de la voie NF $\kappa$ B dans les cellules invalidées pour HIF-1 $\alpha$ . Puisqu'il est déjà établi que dans un contexte inflammatoire et infectieux l'activation de NF $\kappa$ B se fait par des récepteurs membranaires de reconnaissance bactérienne, nous avons émis l'hypothèse que cette régulation de HIF sur NF $\kappa$ B se faisait indirectement. HIF-1 $\alpha$  régulerait l'expression des récepteurs cellulaires comme CEACAM6 et /ou TLR5 ou voir même un récepteur de toxine bactérienne non encore identifié (des récepteurs de toxines bactériennes comme celui de la shiga toxine par exemple [162]). Cette hypothèse est d'autant plus plausible que les AIEC sont capables de réguler l'expression du TLR5 [280]. Il est donc possible de penser que cette régulation se fait via HIF-1 $\alpha$  d'autant plus qu'il existe des HRE en amont du promoteur du gène codant pour TLR5.

La survie des AIEC dans différents types cellulaires, y compris les CEI, est augmentée dans des cellules présentant un défaut autophagique [260; 257]. Il a été montré que d'une part les facteurs HIFs régulent l'expression de cytokines pro inflammatoires et d'autre part ils jouent un rôle important pour la dégradation des bactéries dans les phagocytes [129; 130]. Néanmoins, il a été montré que les AIEC sont normalement prises en charge par les phagosomes dans les CEI [260].

Je me suis intéressée dans un deuxième temps, au rôle potentiel que jouerait HIF-1 dans la survie de ces bactéries. Nous avons démontré dans notre deuxième étude que HIF-1 $\alpha$  contrôle la xénophagie des AIEC au niveau lysosomal. En effet, HIF-1 permet l'adressage des bactéries aux autophagolysosomes ainsi que leur dégradation ; notre étude suggère que ceci passe par le contrôle de gènes clés de l'activité du lysosome. L'activité de ce dernier dépend essentiellement de son pH acide (généré par la V-ATPase, dont les sous-unités ATP6V1H et ATP6V1E sont diminuée au niveau transcriptionnel en l'absence de HIF-1 $\alpha$ ) et de l'expression de cathepsines qui dégradent le contenu des vésicules avec lesquelles le lysosome fusionne (la cathepsine CTSL2 est diminuée en absence de HIF-1 $\alpha$ ). En accord avec ceci, nos expériences sur des cellules infectées par les AIEC et marquées avec une sonde de pH lysosomal (lysotracker) démontrent une diminution du signal dans les cellules invalidées pour HIF-1 $\alpha$ . Il reste donc ici à décortiquer le mécanisme d'entrée des AIEC (actif par sécrétion d'effecteurs qui déforment la surface des cellules ou passif par endocytose) ainsi que le mode d'internalisation de ces bactéries (vacuolaire ou cytoplasmique). Nos données préliminaires semblent indiquer une endocytose vacuolaire car les AIEC sont retrouvés dans endosomes précoces et nous n'avons pas détecté de bactéries liées à EEA-1 seul ce qui nous guide vers une prise en charge xénophagique. De plus, la voie classique de ciblage xénophagique étant la voie ubiquitine-p62-LC3-II, le fait de déterminer si les AIEC sont ubiquitinées étayerait cette hypothèse.

En condition physiologique il existe un équilibre entre la flore microbienne et la réponse cellulaire de l'hôte. Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence la complexité de cet équilibre en mettant en lumière un double rôle de HIF-1 $\alpha$  dans la MC en réponse aux AIEC. D'un côté, il favorise la mise en place d'une réponse pro angiogénique et pro inflammatoire qui s'avère être délétère au niveau intestinal. D'un autre côté il est responsable de la clearance des AIEC par le processus xénophagique dans les CEI. Ce rôle nécessite donc des



investigations plus poussées et HIF apparait comme un axe d'étude important dans la réponse aux AIEC.

Nous proposons comme perspective pour ces études de confirmer dans des modèles murins qui répondent à une infection chronique par les AIEC (CEABAC10), le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans la mise en place des réponses pro inflammatoire et pro angiogénique dans un premier temps puis d'étudier à long terme si les bactéries ont un potentiel pro-tumoral et l'impact des réponses dépendantes de HIF-1 sur l'apparition de tumeurs coliques. Sur ces mêmes modèles nous pourrions aussi décortiquer le rôle de HIF-1 dans la xénophagie des AIEC.

Ces études permettraient de mieux comprendre la réponse de l'hôte dans la pathologie des MICI afin d'apporter des alternatives thérapeutiques aux patients MC traités actuellement avec des anti TNF, des AINS ou des corticoïdes.

## ***Annexe***

# Subversion of Autophagy in Adherent Invasive *Escherichia coli*-Infected Neutrophils Induces Inflammation and Cell Death

Abderrahman Chargui<sup>1,2,3</sup>, Annabelle Cesaro<sup>1,2,3</sup>, Sanda Mimouna<sup>1,2,3</sup>, Mohamed Fareh<sup>2,4</sup>, Patrick Brest<sup>1,2,3</sup>, Philippe Naquet<sup>5</sup>, Arlette Darfeuille-Michaud<sup>6,7</sup>, Xavier Hébuterne<sup>1,2,3,8</sup>, Baharia Mograbi<sup>1,2,3,\*</sup>, Valérie Vouret-Craviari<sup>1,2,3,\*</sup>, Paul Hofman<sup>1,2,3,9,\*</sup>

**1** Institute for Research on Cancer and Aging, Nice, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1081/Centre National de la Recherche Scientifique UMR7284, Team 3, Nice, France, **2** Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France, **3** Equipe Labellisée Fondation Association pour Recherche sur le Cancer, Villejuif, France, **4** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U898, Nice, France, **5** Centre d'immunologie de Marseille-Luminy, UMR 631, Marseille, France, **6** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1071, Clermont-Ferrand, France, **7** Institut National de la Recherche Agronomique, USC2018, Clermont-Ferrand, France, **8** Département de Gastroentérologie, Hôpital de l'Archet, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France, **9** Laboratory of Clinical and Experimental Pathology and Human Biobank, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pasteur Hospital, Human Biobank, Nice, France

## Abstract

Invading bacteria are recognized, captured and killed by a specialized form of autophagy, called xenophagy. Recently, defects in xenophagy in Crohn's disease (CD) have been implicated in the pathogenesis of human chronic inflammatory diseases of uncertain etiology of the gastrointestinal tract. We show here that pathogenic adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolated from CD patients are able to adhere and invade neutrophils, which represent the first line of defense against bacteria. Of particular interest, AIEC infection of neutrophil-like PLB-985 cells blocked autophagy at the autolysosomal step, which allowed intracellular survival of bacteria and exacerbated interleukin-8 (IL-8) production. Interestingly, this block in autophagy correlated with the induction of autophagic cell death. Likewise, stimulation of autophagy by nutrient starvation or rapamycin treatment reduced intracellular AIEC survival and IL-8 production. Finally, treatment with an inhibitor of autophagy decreased cell death of AIEC-infected neutrophil-like PLB-985 cells. In conclusion, excessive autophagy in AIEC infection triggered cell death of neutrophils.

**Citation:** Chargui A, Cesaro A, Mimouna S, Fareh M, Brest P, et al. (2012) Subversion of Autophagy in Adherent Invasive *Escherichia coli*-Infected Neutrophils Induces Inflammation and Cell Death. PLoS ONE 7(12): e51727. doi:10.1371/journal.pone.0051727

**Editor:** Ben Adler, Monash University, Australia

**Received:** July 2, 2012; **Accepted:** November 5, 2012; **Published:** December 14, 2012

**Copyright:** © 2012 Chargui et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Funding provided by Infectiopol Sud PACA (A. Chargui: postdoctoral fellowship), Association François Aupetit, "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale", "Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie" (A B and A. Cesaro: convention ADEME n° 08 62 C 0044), "Agence régionale santé Provence Alpes Côte d'Azur and Direction régionale de l'Environnement, de l'aménagement et du logement" (A B: plan régional santé environnement PRSE PACA n° 6.3.3.3). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mograbi@unice.fr (BM); hofman.p@chu-nice.fr (PH); vouret@unice.fr (VVC)

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Host survival is dependent on effective recognition and killing of pathogens. Professional phagocytes such as neutrophils, macrophages and dendritic cells directly kill microorganisms through phagocytosis and via the production of reactive oxygen intermediates, proteolytic enzymes and cytokines. Among these cells, neutrophils are the first line of innate defence recruited at the site of infection. Upon pathogen clearance, the rapid execution of neutrophil death is central for the resolution of infection. These cells have a short life span in the circulation—only 5 days—and rapidly go into apoptosis [1]. Conversely at sites of inflammation, the lifespan of neutrophils is dramatically prolonged and other forms of cell death than apoptosis have been described; including NETosis, a programmed cell death that leads to neutrophil extracellular trap formation [2], and autophagy [3,4,5]. However, the type of neutrophil cell death induced by bacterial pathogens still remains elusive. This issue is critical as excessive or

dysregulated neutrophil responses contribute to persisting tissue damage that underlies many inflammatory diseases.

Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) have been isolated from the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease (CD), a chronic inflammatory bowel disease of uncertain pathogenesis. The AIEC reference strain LF82 is able to adhere to intestinal epithelial cells [6], to invade epithelial cells, and to survive and replicate within macrophages [7,8]. Following uptake, AIEC are wrapped into a host-cell derived phagosome, which matures from an early to late phagosome and fuses with lysosomes to form the degradative phagolysosome [9]. The harsh environment of phagolysosomes finally destroys the microorganism. However, AIEC pathogenic bacteria replicate in high numbers in mucosal cells of CD patients [10]. Recently, xenophagy, a specialized form of autophagy, has emerged as a critical mechanism in the capture and lysis of invasive bacteria [11,12,13]. Moreover, most studies showing xenophagy-mediated killing of bacteria concern mono-

cytes [14], macrophages [15,16], or epithelial cells (for review see ref [17]).

The role of xenophagy in human neutrophils, both in bacterial killing and in the execution of neutrophil cell death, has not been elucidated to date. To address this issue, we focused our attention on autophagy induced by the interaction between neutrophils and the AIEC LF82 strain.

## Materials and Methods

### Cell Culture

Venous blood was collected from healthy donors after obtaining informed consent. Neutrophils were then isolated from whole blood using a gelatin-sedimentation technique as previously described in [18]. Blood neutrophils are extremely short-lived cells that are not transfectable. To get around this limitation, we used the human myeloid cell line, PLB-985, that differentiates *in vitro* into mature neutrophil-like cells [19] and have been described to produce ROS on challenge with *E. coli* [20].

PLB-985 cells (a gift from Pr Sylvie Chollet-Martin, Paris, France) were maintained in RPMI 1640-GlutaMax medium (Gibco, Invitrogen, France) supplemented with 10% fetal calf serum (BioWhittake Lonza; Verviers, Belgium), 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin at a density of  $0.2\text{--}1 \times 10^6$  cells/ml. For neutrophil-like differentiation, exponentially growing cells ( $0.2 \times 10^5$ /ml) were cultured in the presence of 0.5% *N,N*-dimethyl formamide (DMF; 08796DM, Sigma), 1% Nutridoma-SP (11011375001, Roche; Mannheim, Germany), and 0.5% FCS, as previously described [20,21].

To inhibit autophagy we engineered a cell line silenced for ATG5 expression. Short hairpin RNA (shRNA) lentivirus against *atg5* (Sigma, human NM\_004849) and control shRNA lentivirus (SHC002V, Sigma) were transduced into PLB-985 cells. *Atg5* shRNA-transduced cells were selected in puromycin and assayed for *Atg5* silencing by qRT-PCR using specific primers (see Table S1 for sequences).

### Bacterial Strains

The AIEC strain LF82 was isolated from a chronic ileal lesion of a patient with Crohn's disease [22]. We used the K12 *E. coli* strain C600 as a non-invasive and non-pathogenic control bacteria. Bacteria were cultured as previously described [22].

### AIEC Infection, Invasion and Survival Assay in Human Neutrophils and Differentiated PLB-985 Cells

Prior infection of neutrophils and differentiated PLB-985 cells ( $1 \times 10^6$  cells/condition) were incubated 30 min in RPMI supplemented with 1% FCS. Cells were then incubated with bacteria at a multiplicity of infection (MOI) of 50. Intracellular survival was assessed by the gentamycin assay as described in [7]. All infections were performed in duplicate, and each experiment was repeated 3 times.

### Analysis of Autophagy

As recommended in [12], we used transmission electron microscopy (TEM), confocal microscopy and immunoblotting to study the consequences of AIEC infection on autophagy in neutrophils. The formation of autophagic vesicles was analysed at the ultrastructural level using a Jeol EXII transmission electron microscope. Human neutrophils or differentiated PLB-985 cells were infected for the indicated time and fixed with ice-cold 3% glutaraldehyde in 0.1 M Na cacodylate, pH 7.4 for 2 h. Fixed cells were processed as described in [2].

To confirm the activation of autophagy we studied the formation of autophagolysosome by indirect immunofluorescence staining and confocal microscopy. In particular, the subcellular distribution of LC3-II, a specific marker of autophagosomes, (1:500, mouse, clone 5F10, Nanotools) and LAMP-1, the lysosome-associated membrane protein-1, (1:1000, goat, Santa Cruz biotechnology) were analysed.

Finally, to confirm autophagy, we studied the autophagic flux. For that purpose control- or infected-cells were incubated with specific lysosomal protease inhibitors (Pepstatin A and E64d, 10 µg/mL, Sigma) or the inhibitor of autophagy 3-methyladenine (3-MA, 5 mM, Sigma) and the levels of the autophagosome-associated LC3-II protein (Nanotools, clone 5F10, dil. 1/1000, which preferentially recognizes LC3-II), and the substrate p62/SQSTM1 protein (BD Transduction Laboratories™; # 610833, dil. 1/1000) were analyzed by immunoblotting.

To inhibit autophagy, cells were treated with 3-methyladenine (3-MA, 5 mM, Sigma), which inhibits the formation of autophagic vesicles as described in [12].

### RT-qPCR Procedure

Total RNA was isolated from cells with TRIzol Reagent (Invitrogen) and 1 microgram was reversed transcribed using the SuperScript III First Strand kit (Invitrogen). Quantitative RT-PCR analysis was performed on a 7500 Real-Time PCR system and SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Life Technology, California, USA) as previously described in [1]. Relative changes in gene expression (see Table S1 for primer sequences) are reported as fold changes compared to the untreated cell sample.

### Detection of Neutrophil Cell Death

To study cell death induced by intracellular bacteria, cells were infected at a MOI of 50 for 1 h, rinsed in RPMI containing 0.5% FCS and gentamycin (100 µg/ml) and incubated in the same medium for 5 h. When indicated, a pan caspase inhibitor (z-VAD FMK (Bachem, N-1560; 100 µM) or an inhibitor of autophagy (3-MA, 5 mM) was added to cultures 30 min before infection. Infected cells were washed in PBS and the features of dead cells were measured by uptake of propidium iodide and activity of caspase 3. For propidium iodide uptake, infected cells were stained for 5 min with the red-fluorescent probe propidium iodide (5 µg/mL) and the acquired fluorescence within 30 min was measured with a FACS Calibur flow cytometer. Analyses were performed using CellQuest software (BD Biosciences). For caspase 3 activity, lysates (50 µg) were incubated with the caspase-3 fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC (0.2 mM, ALEXIS Biochemicals). Hydrolysis was followed at different times at 37°C as described by the manufacturer. The results were expressed as arbitrary units. For positive controls, cells were incubated with etoposide phosphate (100 µg/ml; Sigma) or staurosporine (10 µM; Sigma).

Alternatively, procaspase-3 cleavage (a signature of cells undergoing apoptosis) was analyzed by immunoblotting using an anti-caspase-3 antibody (1:1000, rabbit, Cell Signaling Technology). In addition, the cleaved fragment of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP, 85 kDa), a caspase-3 substrate, was analyzed with anti-PARP (1:1000, rabbit, Cell Signaling Technology).

### Statistical Analysis

Results are expressed as means  $\pm$  sem. PLB-treated and untreated cells were compared using the Student *t* test. The differences between AIEC LF82 and K12 infection were compared using the Kruskal Wallis test followed by the Mann

Whitney U test. A  $P$  value less than 0.05 were considered significant.

## Results

### Intracellular Survival of AIEC within Neutrophils

Since AIEC are able to adhere to and invade epithelial cells and macrophages [7,8], the aim of this study was first to evaluate whether AIEC LF82 invade and survive within neutrophils and second to analyze the consequence of survival of intracellular bacteria on neutrophil life span. For this purpose, we first infected peripheral blood neutrophils with AIEC LF82 at a MOI of 50 and followed survival of bacteria over time in presence of gentamicin. Recovery of intracellular bacteria showed that live bacteria invade neutrophils. Interestingly, AIEC LF82 bacteria were able to replicate, as a 3-fold increase in the intracellular counts of AIEC was observed 5 h post gentamicin treatment (Fig. 1A). To study in depth the consequences of AIEC infection in neutrophils, we used the human myeloid cell line PLB-985 differentiated into neutrophils [19,21]. As illustrated in the insets of Fig. 1, these differentiated cells were morphologically similar to human neutrophils with a multilobed and fragmented nucleus. Further, differentiation was confirmed by: *i*) morphology of May-Grünwald-Giemsa stained cells and *ii*) cell surface expression of CD11b (see Fig. S1). When neutrophil-like differentiated PLB-985 cells (Fig. 1B) were infected with AIEC LF82 bacteria, we observed that bacteria survived intracellularly and were able to divide with a maximum observed 3 h post gentamicin treatment. In both cell types, AIEC replication was transient, as the CFU returned to the basal levels 8 h after gentamicin treatment. Therefore, we wondered whether this rapid eradication of the pathogen could

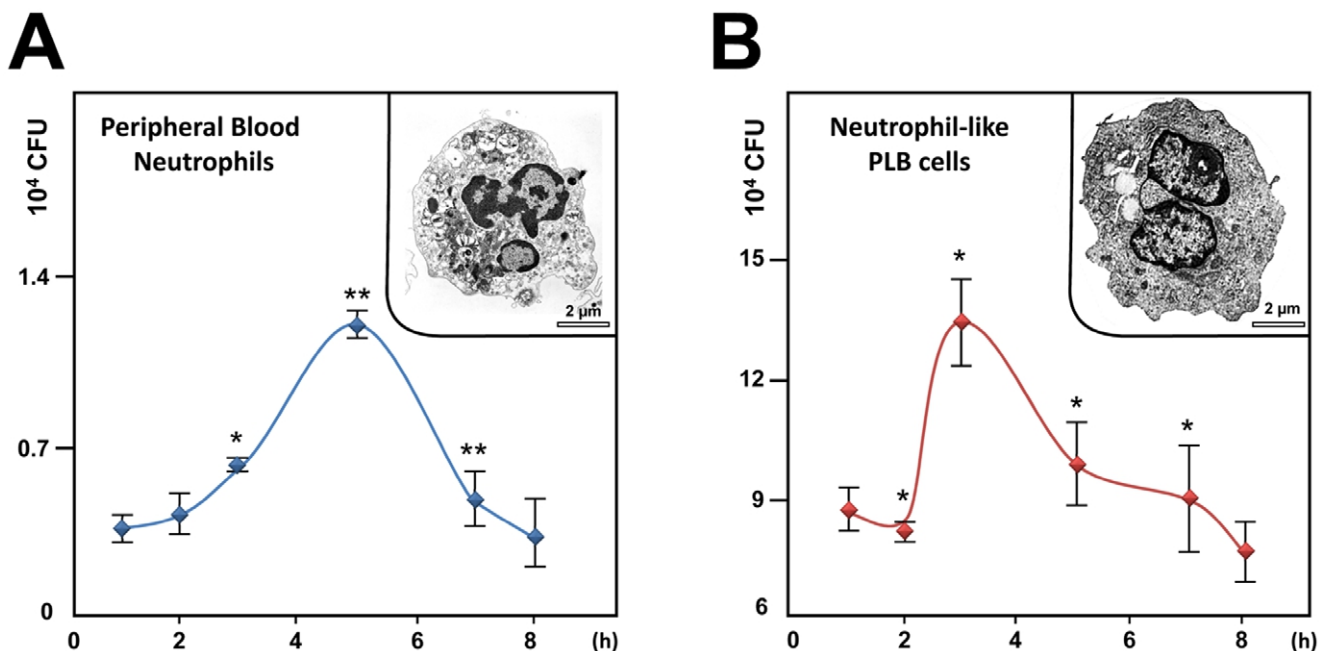
result from effective intracellular killing of bacteria and/or increased neutrophil cell death.

### AIEC LF82 Subverts the Autophagic Pathway at the Degradation Step to Promote their Survival

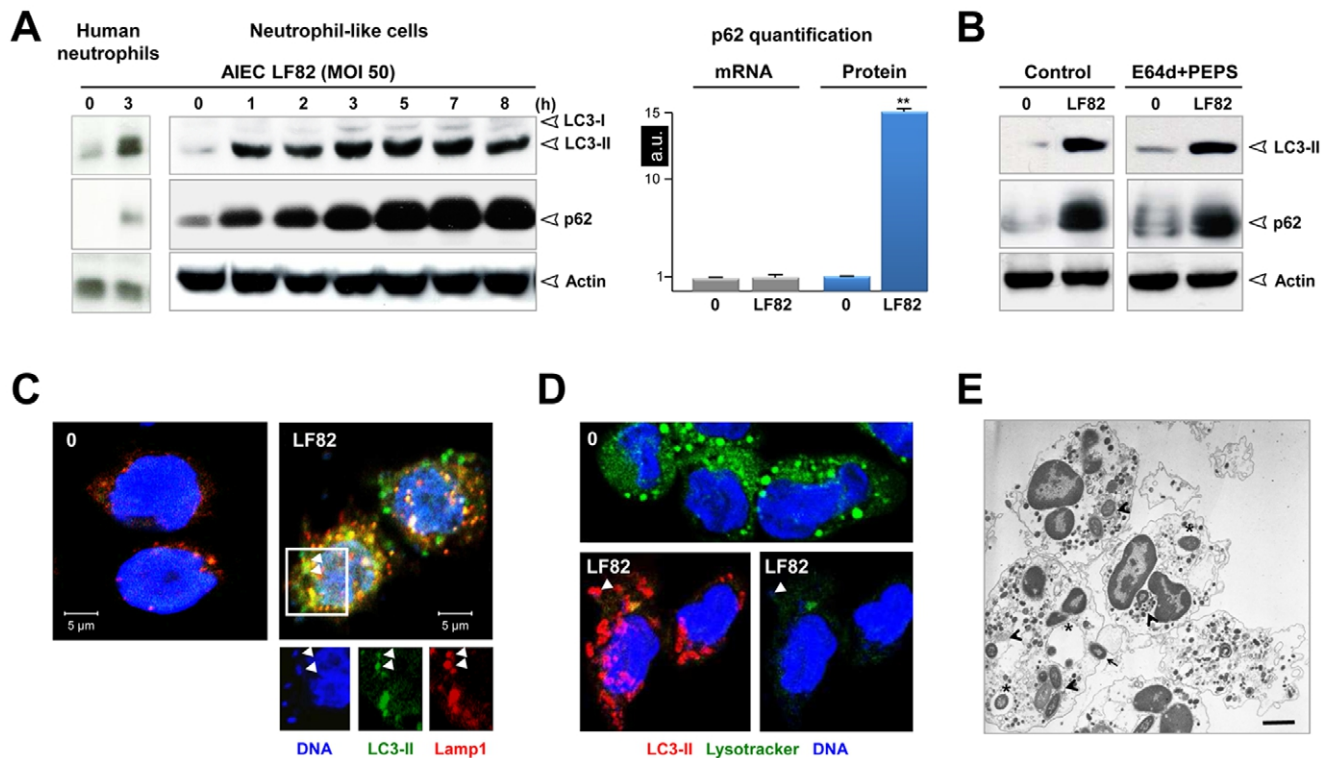
Autophagy can play an important part in protecting host cells during bacterial infection and several pathogens have developed strategies to evade or even exploit this pathway [23]. Activation of autophagy was examined by formation of microtubule-associated protein 1 light chain 3-II (LC3-II), a specific and sensitive marker of autophagy [12].

Following infection with the AIEC LF82 strain, formation of LC3-II was strongly induced in human neutrophils, demonstrating for the first time that live intracellular *E. coli* are efficient inducers of autophagy in this cell type (Fig. 2A, left panel). A study of the kinetics of infection of differentiated neutrophil-like PLB-985 cells revealed that the band corresponding to LC3-II appeared in a time-dependent manner. LC3-II formation started at 1 h post AIEC infection to reach a plateau by 3 h, which lasted 7 h before slowly declining at 8 h. Physiologically, autophagy is a dynamic process and autophagosomes are formed and degraded within seven minutes. As a result, only a few autophagic vesicles and low LC3-II levels are detected under nutrient starvation [24]. While accumulation of autophagosomes has been documented in AIEC-infected epithelial cells (HeLa, Hep-2 and Intestine-407) [6], no information is available regarding the autophagic flux in AIEC-infected cells.

Sustained accumulation of LC3-II in differentiated neutrophil-like cells may reflect either increased formation or impaired degradation of autophagic vesicles [12]. To discriminate between these two distinct scenarios, we assessed the accumulation of LC3-II in the presence of the lysosomal protease inhibitors E64d and



**Figure 1. AIEC invade and replicate within PMN.** A) Peripheral blood PMNs or B) differentiated PLB-985 cells were infected with AIEC LF82 at a multiplicity of infection (MOI) of 50. The survival of bacteria was measured by the gentamicin protection assay. After 1 h of infection (50 MOI), peripheral blood PMNs and differentiated PLB-985 cells were incubated with gentamicin (100  $\mu$ g/ml). At the indicated times, cells were washed with PBS and lysed with PBS 1% Triton X-100. The CFUs were determined on LB agar plates. The data are representative of 5 independent experiments. Inset: representative transmission electron micrograph (TEM) pictures of differentiated PLB-985 cells showing the characteristic segmented nuclei of mature PMN with connected lobes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.02$ . doi:10.1371/journal.pone.0051727.g001



**Figure 2. Inhibition of autophagic flux by AIEC LF82 infection.** Human neutrophils or neutrophil-like PLB-985 cells were infected with AIEC LF82 at a MOI of 50 for 1 h than gentamicin (100  $\mu$ g/ml) was added for 3 h. Cells were and processed for immunoblotting (**A**, left panel, **B**), quantitative RT-PCR (**A** right panel), immunofluorescence (**C**, **D**) and ultrastructural TEM analysis (**E**). (**A**) Time-dependent accumulation (1–8 h) of LC3-II and p62 in infected human neutrophils or neutrophil-like PLB-985 cells compared to uninfected cells analyzed at the end time point. Longer exposure detects the LC3-I band. We checked that AIEC infection did not affect p62 mRNA levels by qRT-PCR analysis (**A** right panel). Data are means  $\pm$  SEM of three experiments. \*\*  $p < 0.001$ . (**B**) Autophagic flux was analysed by immunoblot analysis in differentiated PLB-985 cells infected for 3 h with AIEC LF82 bacteria (MOI 50) in the absence or in the presence of E64d/PEPS. Actin was used as a loading control. Control unstimulated cells were analysed at the end time point. (**C**) Representative confocal images of control (0) or infected cells (LF82) (3 h post infection) showed the colocalization of bacteria with LC3-II and LAMP-1 proteins as indicated by yellow punctiform staining. Insets highlight individual staining of bacteria (DNA staining, blue), LC3-II (Alexa 488, green) and LAMP-1 (Alexa 594, red). (**D**) Representative confocal micrographs of control (0) and LF82 infected cells (LF82) showing the co-localization of bacteria (DNA staining, blue) within autophagic (LC3-II positive, Alexa 594, red) but not acidic compartments (LysoTracker negative, green). (**E**) Representative TEM images showing bacteria within endosomes (asterisk), autophagosomes (arrowheads) or free in the cytosol (arrow) in LF82-infected cells (3 h post infection). Bar = 2  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0051727.g002

Pepstatin. Cells treated with E64d/Pepstatin and infected with AIEC LF82 did not exhibit further accumulation of LC3-II compared to infected cells (Fig. 2B). Likewise, the autophagic substrate, p62/SQTM1 [25], rapidly accumulated in AIEC-infected cells and was unchanged when autophagy was impaired by E64d/pepstatin treatment, which further supported inhibition of the autophagic flux (Fig. 2A–B). The increase in p62 protein levels in AIEC-infected cells corresponded to a reduction in the autophagic flux as comparable levels of *p62* mRNA were measured in control and infected cells (Fig. 2A, right panel). The same p62 accumulation was observed in AIEC-infected human neutrophils. Together, this suggests that AIEC infection impaired the autophagic flux in neutrophils.

We then questioned which step in the autophagy pathway was stopped/delayed by AIEC infection. Autophagy begins with the formation of a double-membrane autophagosome that stains positive for LC3-II. The autophagosome then rapidly fuses with a lysosome to become a single-membrane autolysosome that co-stains for LC3-II and Lamp-1 and degrades the contents by acid hydrolases. Non infected cells contained little if any vesicles positive for LC3-II (Fig. 2C, left panel). In contrast, infection led to an overall increase in LC3 positive vesicles. Interestingly we

observed that 31% of the bacteria co-localized within LC3-II positive vesicles whereas 45.7% of the bacteria were present in vesicles positives for LC3-II and Lamp-1 (Fig. 2C and Fig. S2B). We therefore determined whether AIEC survive within autolysosomes by affecting the lysosomal pH. For this purpose, uninfected and infected (3 h post infection) cells were labeled during the last 30 minutes of incubation with LysoTracker (green), a probe that detects acidic compartments. As expected, LysoTracker showed the presence of acidic compartments in uninfected neutrophil-like PLB 985 cells (Fig. 2D). However, following infection, all bacteria (blue staining for DNA) resided within non-acidic (LysoTracker negative) and LC3 positive vesicles.

The above results indicate that intracellular AIEC co-localized with the autophagy marker LC3 in infected neutrophil like cells. Invasive bacteria are targeted by host autophagy through three distinct pathways: *a*) autophagosomes may directly sequester bacteria free in the cytosol [26]; *b*) autophagosomes may engulf bacteria-containing phagosomes [27]; and *c*) LC3 may be recruited directly to bacteria-containing phagosomes thus stimulating phagosome maturation (LC3-associated phagocytosis [28]).

To investigate which of these pathways may be responsible for AIEC co-localization with LC3 in infected PBL cells, we studied

the kinetics of infection and examined the cells with transmission electron microscopy (TEM). Thirty minutes after infection, 62% of the bacteria were localized within endosomes and 38% were present in canonical double-membrane autophagosomes (Fig. 2E and Fig. S2C). One hour after infection the percentage of bacteria within autophagosomes increased to 56.2% and fewer bacteria were present in endosomes (44.8%). Finally, after 2 h some bacteria (17.6%) were found to be free within the cytosol of infected cells. Interestingly, these bacteria were electron dense, suggesting that they were viable (see Fig. S2C). Together these results supported the hypothesis that AIEC can be targeted by canonical autophagy. Taken together, these findings established that the initial step of autophagic maturation (*i.e.* fusion of autophagosomes with lysosomes) occurred in AIEC-infected cells. However, the autolysosomes in which AIEC resided were non-degradative; indicating that the bacteria were capable of either delaying or preventing the full maturation of autolysosomes and of limiting the AIEC-induced inflammatory response.

### Upregulating Autophagy Kills Intracellular AIEC in Neutrophils and Limits the AIEC-Induced Inflammatory Response

To gain insight into the role of autophagy in AIEC infection, we inhibited the formation of autophagosomes at the initiation step with *Atg5* short hairpin RNA (shRNA) in the neutrophil-like PLB-985 cells. The effective knockdown of *Atg5* was confirmed by qRT-PCR (Fig. 3A, left panel) and we verified that *atg5* silencing did not perturb cell differentiation and cell infection (see Fig. S3A to D). We found that AIEC survived intracellularly twice as much as in *Atg5*-depleted cells than in control cells (Fig. 3A, right panel). These results established that *Atg5*-dependent autophagy plays an essential role in controlling intracellular AIEC survival in differentiated neutrophils.

In contrast, stimulation of autophagy by nutrient starvation (HBSS) or rapamycin treatment eliminated mycobacteria in macrophages [27], and AIEC in epithelial cells [6] and in macrophages [15]. We therefore addressed whether upregulating autophagy in neutrophils could reduce AIEC viability. Differentiated PLB cells were infected and incubated in nutrient deprived medium. Alternatively, following AIEC infection, cells were stimulated for 3 h with rapamycin, a pharmacological inducer of autophagy. Rapamycin treatment reduced by 70% the survival of AIEC in neutrophil-like cells (Fig. 3B, left panel). This antibacterial effect was due to the restoration of the autophagic flux, as shown by a decrease in the level of the substrate LC3-II of autophagy (Fig. 3B, right upper panels). As expected, physiological induction of autophagy by nutrient starvation (amino acid/serum-deprived HBSS medium) gave a similar decrease in the number of intracellular LF82 bacteria and restored the autophagic flux. Given that in macrophages autophagy helps to control the intensity of the inflammatory response [29], we next examined whether autophagy plays a similar role in AIEC-infected neutrophil-like cells. AIEC infection of PLB 985 cells dramatically induced the production of inflammatory cytokine IL-8 (Fig. 3C and D). Blocking autophagy with *Atg5* shRNA markedly increased IL-8 expression, while enhancing autophagy by starvation or rapamycin treatment had the opposite effect. The modulation of IL-8 production by autophagy was induced at the level of gene transcription and correlated with the intracellular bacterial load. Indeed, the non-pathogenic *E. coli* K12 strain, which does not survive within differentiated PLB-985 cells (see Fig. 4D), was a poor inducer of IL-8 mRNA expression (4-fold) whereas AIEC-LF82 bacteria induced a 25-fold increase (Fig. S3E). Therefore, in

neutrophils, autophagy controls the production of inflammatory cytokines by eliminating pathogens.

### Infection with the AIEC LF82 Strain Induced Autophagic Death of Neutrophils

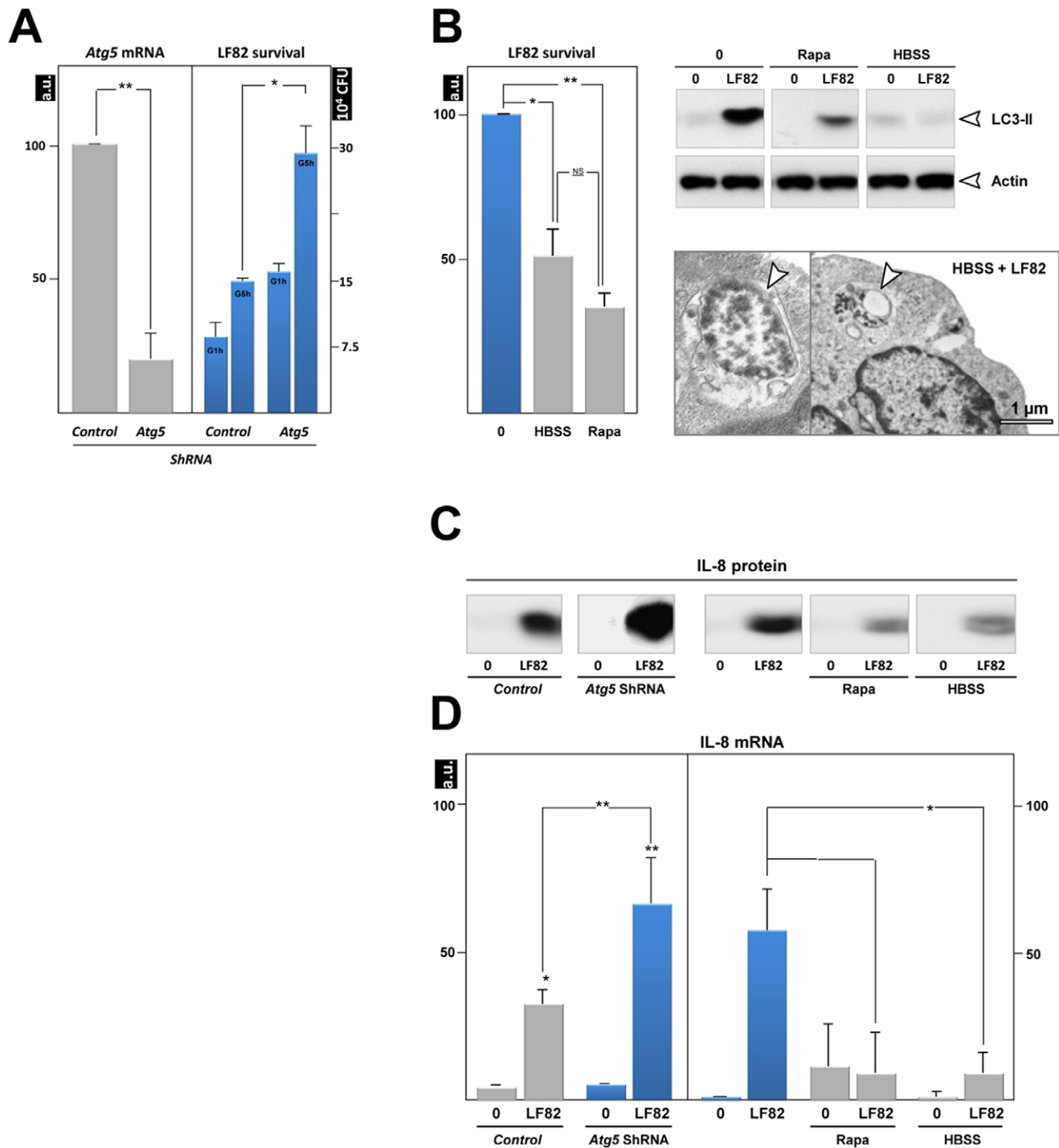
At the site of infection, neutrophil viability is regulated and the neutrophil half-life is first enhanced to ensure the anti-microbial action. Once the invading bacteria are eradicated, neutrophils then undergo apoptosis to prevent tissue damage. Interestingly, many invasive pathogens (*Chlamydia pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) subvert neutrophils death (for review [30,31]). Prompted by the observation that AIEC-infected macrophages do not undergo cell death [6], we examined whether AIEC infection can modulate neutrophils life span.

Neutrophil death was assessed by flow cytometry as measured by an increase in cell permeability to propidium iodide (PI). 15% of uninfected neutrophil-like PLB 985 cells were positive for propidium iodide. Infection with the AIEC LF82 strain gave rise to a 3.3-fold increase in the percentage of dying cells, which indicated that bacteria induced massive cell death in differentiated neutrophil-like cells (Fig. 4A). Similarly, AIEC LF82 infection induced death of human peripheral blood neutrophils (Fig. 4B).

Apoptosis, autophagy or necrosis trigger cell death. To distinguish which of these scenarios is triggering neutrophil death, we pretreated the cells with either 3-methyladenine (3-MA), which blocks autophagosome formation or Zvad, a well characterized inhibitor of caspase-dependent apoptosis. Interestingly, 3-MA treatment inhibited by 2-fold the percentage of PI positive cells under AIEC challenge, whereas Zvad had no effect. We then analyzed several biochemical and morphological hallmarks of apoptosis. Consistently, little, if any, caspase-3 enzyme activity was detected in AIEC-infected neutrophils, whereas the positive control increased by more than 30-fold the activity of the enzyme (Fig. 4B, right). Consistently, AIEC failed to induce cleavage of caspase-3 and of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in differentiated neutrophil-like cells (Fig. 4C). Taken together, these data imply that AIEC LF82 induced a caspase-independent cell death in neutrophils.

Recently, excessive “autophagic” cell death (type II) has been reported to trigger non-apoptotic cell death in response to sustained stress [32]. Whether the ability of AIEC LF82 bacteria to survive within neutrophils produces a stress sufficient to induce autophagic cell death remains to be determined. To address this question, we studied the interaction of non-pathogenic bacteria with neutrophils. As shown in Figure 4A, infection with the non-pathogenic *E. coli* K12 strain had no effect on cell viability, suggesting that induction of neutrophil death is a feature of pathogenic bacteria. Interestingly, some bacteria invaded neutrophils, but their number decreased by more than 2-fold, indicating that they were killed within phagosomal/autophagic vesicles (Fig. 4D, left panel). In agreement with this hypothesis, K12 bacteria induced a lower level of LC3-II formation compared with LF82-infected cells (Fig. 4C) and we observed at the ultrastructural level that neutrophils infected with the non-pathogenic K12 bacteria did not contain autophagic vesicles (Fig. 4D). By contrast, we confirmed the induction of autophagic cell death by the accumulation of autophagic vesicles within the cytosol of both AIEC-infected neutrophil-like PLB-985 cells (Fig. 4D, third panel) and AIEC-infected human neutrophils (Fig. 4E, fourth panel). Meanwhile, the morphological hallmarks of apoptosis, such as cell shrinkage, membrane blebbing, nuclear condensation, or nuclear fragmentation, were not observed in these cells. Beside autophagy, activated neutrophils undergo an alternative cell death process called NETosis. NETosis consists of the release of neutrophil



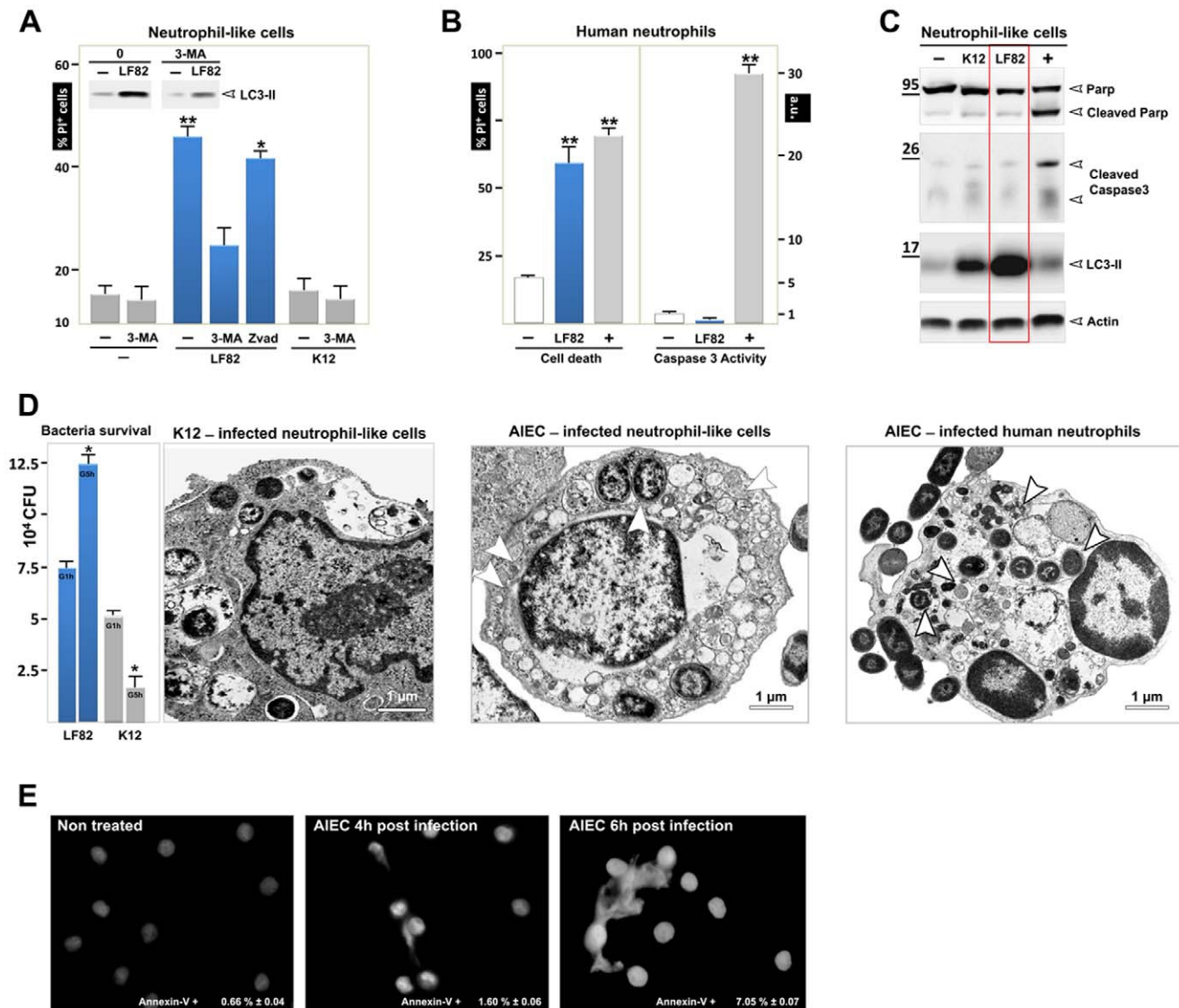


**Figure 3. Modulation of autophagy affects AIEC survival.** PLB-985 cells were transduced with either *Atg5* shRNA or the control shRNA, differentiated and then infected with LF82 (50 MOI). **(A)** A defect in autophagy (*Atg5* silencing) favours intracellular survival of bacteria. Intracellular bacteria were numbered 1 h and 5 h after addition of gentamycin. Data are means  $\pm$  SEM of three experiments. \* $p$ <0.01 and \*\* $p$ <0.003. Silencing of *Atg5* mRNA was confirmed by RT-PCR analysis (left). **(B)** Two inducers of autophagy, nutrient starvation (HBSS) and rapamycin (rapa, 100 nM in complete medium) decreased intracellular LF82 survival (left), rescued the autophagic flux (as shown by detection of LC3-II, upper right), and increased bacterial degradation (lower right, arrowhead, transmission electron micrograph). Modulation of LF82-induced IL-8 production in response to inhibition of autophagy (*Atg5* shRNA) or to stimulation of autophagy (rapamycin or starvation) was analyzed by immunoblotting **(C)** and qRT-PCR **(D)**. The average  $\pm$  S.D. is shown for three independent experiments, \* $p$ <0.01 and \*\* $p$ <0.003. doi:10.1371/journal.pone.0051727.g003

extracellular traps (NETs) composed of chromatin and granules of proteins, which bind and kill microorganisms [4]. Therefore we wondered whether AIEC-infected neutrophils could go into

NETosis. Neutrophil trap formation was analyzed by immunofluorescence microscopy on coverslips seeded with differentiated PLB-985 cells infected or not with AIEC-LF82. As shown in





**Figure 4. PMNs undergo autophagic death and NETosis on infection with AIEC LF82.** Differentiated PLB-985 cells or PMN were infected (MOI 50) with K12 or AIEC LF82 bacteria for 1 h and gentamycin was added for the following 5 h, cells were then analysed. (A) Control or K12- or AIEC LF82-infected PLB-985 cells, treated or not with 3-methyladenine (3-MA, 5 mM, autophagy inhibitor) or Zvad (5  $\mu$ M, a pancaspase inhibitor), were incubated with propidium iodide (PI) (5  $\mu$ g/ml) and cell death was analysed by flow cytometric analysis as described in the materials and methods section. The average  $\pm$  S.D. is shown for three independent experiments, \* $p$ <0.003. Inset: immunoblot analysis of LC3-II testifying to the induction of autophagy in infected cells. (B, left panel) PMNs were infected with AIEC LF82 and cell death was assayed as described in A. Maximal cell death (+) was obtained after treatment with etoposide phosphate (100  $\mu$ g/ml). To test whether cell death was due to apoptosis, a caspase-3 activity test was performed as described in the materials and methods section (right panel). Maximal cell apoptosis (+) was obtained by treatment with staurosporine (10  $\mu$ M). (C) Cleavage of PARP and caspase-3 in non-infected or K12- and AIEC LF82-infected differentiated PLB-985 cells were analysed by immunoblot analyses. Etoposide phosphate (100  $\mu$ g/ml) was used as a positive control. LC3-II was detected in LF82-infected cells and compared to uninfected or K12-infected cells (1+5 h, MOI 50). Actin was used as a loading control. (D) Survival of AIEC LF82 and K12 in differentiated PLB-985 cells was analysed with the gentamycin assay (panel one). To compare the ultrastructural morphology of vesicles and bacteria in PLB-985 cells transmission electron microscopy was performed. Ultrastructural analysis of K12-infected differentiated PLB-985 cells shows bacterial sequestration and degradation in phagocytosis vacuoles (panel two). In contrast, accumulation of autophagic vesicles and bacteria (arrowheads) inside the vacuoles was observed in PLB-985 cells (panel three) and PMNs (panel four). Scale bar = 1  $\mu$ m. (E) Differentiated PLB-985 were seeded on glass coverslips coated with poly D lysine (5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) and allowed to settle for 1 h. Cells were then infected with AIEC-LF82 (MOI 50) for 4 h (1 h+3 h) and 6 h (1 h+5 h), fixed with 3% paraformaldehyde and stained with Hoechst 33342 (0.5  $\mu$ g/ml) to visualize DNA. Cells were examined with an epifluorescence Axiophot microscope (Zeiss). Early apoptosis and necrosis were assayed by measuring Annexin-V-fluos (Roche) and propidium iodide (PI). Differentiated non-infected PLB-985 cells or cells infected with AIEC LF82 (MOI 50) for 1 h+5 h were incubated with Annexin-V-fluos and PI and fluorescence was detected on a FACS Calibre.

Fig. 4E, bacterial infection resulted in the release of nuclear DNA into the extracellular medium; this phenomenon, clearly visible 6 h post infection, corresponded to NET formation. AIEC-

induced NET formation is not linked to phosphatidylserine externalization since only 7% of 6 h post infected cells were annexin-V positive. Collectively, these data established that AIEC-

infected neutrophils die as a result of both autophagic and NETosis cell death. However, a delay exists between these two cell death processes; autophagic cell death is visible 4 h post infection whereas NETosis is visible 6 h post infection. This suggests that autophagic cell death may be required to mediate NETosis.

## Discussion

Neutrophils are the most abundant cell type involved in the innate immune response. They are the first cells to be recruited to the site of infection where they engulf and kill invading microorganisms by classical phagocytosis. Indeed, we confirmed that the non-pathogenic *E. coli* K12 strain was phagocytosed and killed by the neutrophil-like PLB-985 cells (see Fig. 4). Beside phagocytosis, the autophagic pathway can play an important part in protecting host cells during bacterial infection, a process named xenophagy, and several pathogens have developed strategies to evade or even exploit this pathway [23]. Xenophagy-mediated killing of bacteria has so far been demonstrated in macrophages [27,33], fibroblasts [34,35], and epithelial cells [26], but no information is available concerning this process in neutrophils.

Using freshly isolated human neutrophils and the human neutrophil-like PLB-985 cells differentiated into mature neutrophils, we reported here that: *i*) neutrophils activated the autophagic machinery as an immediate response to fight AIEC LF82 infection and also to limit the production of inflammatory cytokines. Within the first 30 min of infection, AIEC were found within endosomes (vesicles free of intracellular components) and autophagic vesicles characterized by a double-membrane. These findings showed that AIEC LF82 bacteria entered cells via an endosomal compartment and were further captured by double-membrane autophagosomes. This indicates that AIEC LF82 bacteria are subjected to canonical autophagy instead of the recently described LC3-associated phagocytosis [28]; *ii*) Pathogenic AIEC evaded killing by neutrophil-like PLB cells by disturbing autophagic flux at the autolysosomal degradation step; *iii*) Rather than controlling infection, neutrophils died by AIEC-induced autophagic cell death, *iv*) Stimulation of cytoprotective autophagy by nutrient starvation or rapamycin treatment effectively overcame the AIEC-imposed block in autophagy and thereby reverted the ability of neutrophils to kill AIEC.

Neutrophil death is a key event in fighting infection. Indeed, it is well established that blood neutrophils are short-lived cells, programmed to die by apoptotic cell death [36]. However, several lines of evidence challenge this dogma. At an inflammatory site, a number of cytokines and bacterial products block neutrophils apoptosis to fight bacterial infection. In such an inflammatory environment, Simon HU *et al.* reported recently non-apoptotic neutrophil death that was related to massive PI3K-dependent autophagic vacuolization [3,5].

In the present study we provided evidence of caspase-independent and PI3K-dependent cell death in bacteria-infected neutrophils. At the ultrastructural level, the hallmark of AIEC-infected cells was massive autophagic vacuolization, both in freshly isolated neutrophils and in the neutrophil-like PLB-985 cells. In contrast, dying neutrophils were not characterized by apoptotic features such as nuclei condensation/fragmentation and cell shrinkage. Likewise, the plasma membrane of AIEC-infected neutrophils was intact, excluding classical necrotic cell death. Of interest, this cell death was associated with autophagic (massive production of LC3II, and autophagic vacuolation) but not apoptotic markers (caspase 3 activity, caspase 3 cleavage, and Parp cleavage). In line with this observation, AIEC-infected cells were rescued by a pharmacological inhibitor of autophagy but not

of apoptosis. Taken together, AIEC-infected neutrophils underwent autophagic cell death.

A similar caspase-independent death pathway has been described *in vitro* in neutrophils stimulated with inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , Siglec-9, CD44 ligation and GM-CSF [3,5,37]. Interestingly, neutrophil vacuolization has been observed in patients with inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and sepsis, which demonstrates that this type of cell death occurs *in vivo* [38].

A few years ago the group of Zychlinsky provided evidence of a novel form of neutrophil cell death process called NETosis [39]. Neutrophil extracellular traps (NETs), which are made of chromatin and granules of proteins, allow efficient killing of microorganisms. We demonstrated in the present study that AIEC-infected neutrophils underwent NETosis. Interestingly, this process takes place after autophagy since it requires 6 h of infection whereas autophagy is visible at 1 h post infection with AIEC and reached a plateau by 3 h. Therefore, we characterized the link between autophagy and NETosis by studying trap formation in autophagy deficient PLB Sh-*atg5* cells. As shown in Fig. S4 differentiated PLB Sh-*atg5* cells infected with AIEC-LF82 (MOI 50) for 6 h (1 h+5 h) or treated with 25 nM PMA (as a positive control) were unable to form Traps. This finding was confirmed by two independent studies. In the first one, Remijsen and co-authors demonstrated that PMA-induced NETosis, a mechanism dependent on autophagy and ROS production, was blocked when autophagy is inhibited [40]. In the second, Mitroulis and co-authors have shown that NET production observed in neutrophils from patient with acute gout was inhibited when autophagy was prevented [41]. All together, these findings suggest that autophagic cell death may commit cells to NETosis.

The autophagic neutrophil death that we observed on pathogenic bacterial infection may be of physiological importance. Indeed, the non-pathogenic *E. coli* K12 strain was phagocytized, did not affect cell viability, did not induce IL-8 and was efficiently killed by neutrophils. In contrast, invading AIEC LF82 bacteria induced production of IL-8 and subverted the autophagy pathway as a safe replicative niche. At a later time, AIEC LF82 bacteria overload caused accumulation of autophagic vesicles and cell death. The first obvious effect of this particular cell death was that the plasma membrane of dying neutrophils remained intact, and therefore should not induce further *in situ* inflammation. The second benefit of this cellular suicide is the killing of intracellular AIEC, as suggested by the decrease in intracellular CFU at late times of infection. Similarly, other bacterial pathogens (*Clostridium difficile*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, and *Vibrio cholera*, *Staphylococcus aureus*) that are armed with pili and flagella have been described to subvert the autophagic machinery not only to multiply but also to kill the host epithelial cell by a caspase-independent pathway [42,43].

It should be noted that AIEC induced death in PMNs, but not in macrophages [8] or epithelial cells [6]. This suggests that, within the intestinal epithelium, PMNs have a unique sensitivity to autophagic cell death upon AIEC infection. Together with apoptosis, we therefore propose that autophagic cell death may be a safeguard mechanism to control the number of PMN and thereby limit PMN-mediated chronic inflammation. This mechanism may play a critical role under pathologic conditions. Indeed, a defect in xenophagy due to Atg16L and IRGM polymorphisms has recently been implicated in the pathogenesis of CD [37]. We used freshly isolated PMNs from healthy donors and we checked that the PLB-985 cell line was wild-type for Atg16L and IRGM autophagic genes. Future work may answer the important issue of whether impairment of the initiation of autophagy by Atg16L and

IRGM polymorphisms in CD patients can impair xenophagy and at the same time preserve neutrophil function, and thereby promote prolonged, tissue-damaging chronic inflammation. Understanding the mechanisms involved in PMN xenophagic/autophagic cell death may be of essential interest in developing novel pharmacological therapies to control inflammatory diseases.

## Supporting Information

### Figure S1 Characterization of differentiated PLB-985.

A) Granulocytic differentiation was checked by morphological analysis of cytocentrifuged cells stained with May-Grunwald-Giemsa solution. Neutrophilic maturation is indicated by an increase in pyknosis of nuclei, loss of nucleoli and the appearance of azurophilic granularity in the cytoplasm. B) CD11b expression at the cell surface of non-differentiated PLB-985 cells or cells differentiated for 6 days was analyzed by flow cytometry. Control isotypic (dashed line) superposed with the profile of non-differentiated cells (blue line) whereas the profile of differentiated PLB985 (pink line) migrated to the right. Under this condition we observed a highly reproducible 3-fold increase in CD66b expression ( $n = 3$ ). C) Transmission electron microscopy of non-differentiated or differentiated PLB-985 cells indicated a reduction in nuclei, nuclear indentation and an increase in electron-dense granules in the cytoplasm (arrow heads). D) Stable expression of CD11b by differentiated PLB-985 cells. A time course of expression of CD11b, measured by flow cytometry, of differentiated or non-differentiated cells demonstrated stable expression of CD11b by differentiated PLB-985 cells. (TIF)

### Figure S2 Co-localization of AIEC LF82 bacteria with LC3-II and Lamp-1 in differentiated PLB-985 cells.

A) Representative confocal images of cells infected with AIEC-LF82-GFP bacteria (1+3 h post infection) showed the co-localization of bacteria with LC3-II and Lamp-1 as indicated by white punctiform staining (white arrow head). We show, in the two insets, extranuclear small dots stained with Dapi that correspond to bacteria, all small blue dots are GFP positive. Bar = 5  $\mu\text{m}$  B) Quantification of co-localization of bacteria with LC3-II, Lamp-1 and lysotracker. Pictures of 30 bacteria were taken at x 63 magnification and three-dimensional images were used to assess the co-localization of bacteria (blue) with autophagosomes (green) and autolysosomes (green and red) or bacteria with acidic LC3-II positive vesicles (green and red). Experiments were done in triplicate and quantification is expressed as the mean of 3 experiments in which 30 bacteria were counted per experiment. C) Representative TEM images showing bacteria within endosomes that correspond to single membrane vesicles free of intracellular components (left upper panel, Bar = 200 nm) and double membrane autophagosomes (inset Bar = 200 nm) containing bacteria and cytoplasmic components (left lower panel, Bar = 1  $\mu\text{m}$ ) in LF82-infected neutrophils (1 h post infection). Right panel: quantification of bacteria within intracellular organelles. Pictures of 20 bacteria at 200 nm resolution were taken to perform statistical analysis. (TIF)

## References

- Mimouna S, Goncalves D, Barnich N, Darfeuille-Michaud A, Hofman P, et al. (2011) Crohn disease-associated *Escherichia coli* promote gastrointestinal inflammatory disorders by activation of HIF-dependent responses. *Gut Microbes* 2: 335–346.
- Cesaro A, Brest P, Hofman V, Hebuterne X, Wildman S, et al. (2010) Amplification loop of the inflammatory process is induced by P2X7R activation

**Figure S3 Characterization of PLB *sh-atg5* cells.** A) Granulocytic differentiation was checked by morphological analysis of cytocentrifuged cells stained with May-Grunwald-Giemsa solution. B) CD11b expression at the cell surface of non-differentiated PLB *Sh-atg5* (green line) or cells differentiated for 6 days (purple profile) was analyzed by flow cytometry. C) AIEC LF82 bacteria induced autophagy in both PLB *Sh-ctr* and PLB *Sh-atg5* cells. The level of LC3-II protein expression was analyzed by immunoblotting of cells infected with bacteria at a MOI of 50. Actin staining was used as a control for protein loading. D) Survival of AIEC-LF82 bacteria in differentiated PLB *Sh-ctr* and *Sh-atg5* cells. Cells were infected (1 h+3 h) with AIEC-LF82 bacteria fixed with paraformaldehyde and stained with DAPI (blue) and actin (red). The number of live intracellular bacteria (small intracellular blue dots) is increased in PLB *Sh-atg5* cells versus *Sh-ctr* cells. Bar = 5  $\mu\text{m}$ . E) Expression of IL-8 by differentiated PLB-985 cells in response to *E. coli* K12. IL-8 levels (mRNA, left panel and protein, right panel) were studied in response to non-pathogenic *E. coli* K12 strain versus AIEC LF82 infection. (TIF)

### Figure S4 No NETosis in differentiated PLB *Sh-atg5* cells infected with AIEC-LF82 bacteria.

Differentiated PLB*Sh-atg5* were seeded on glass coverslips coated with poly D lysine (5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) and allowed to settle for 1 h. Cells were then infected with AIEC-LF82 (MOI 50) for 4 h (1 h+5 h) or treated with 25 nM PMA, fixed with 3% paraformaldehyde and stained with Hoechst 33342 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Cells were examined with an epifluorescence Axiophot microscope (Zeiss). Tables, showed early apoptosis and necrosis, assayed by measuring Annexin-V-fluos (Roche) and propidium iodide (PI). Differentiated non-infected PLB *Sh-atg5* cells, cells infected with AIEC LF82 (MOI 50) for 1 h+5 h or cells treated with anisomycin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , positive control) were incubated with Annexin-V-fluos and PI as recommended by the manufacturer. Fluorescence was examined on a FACS Calibure. This experiment showed that differentiated PLB *Sh-atg5* cells were unable to go into NETosis. We also observed nuclear condensation in each of the conditions tested, which suggested that cells impaired in autophagy underwent apoptosis. (TIF)

### Table S1 Sequence of the Primers used in this study. (PDF)

## Acknowledgments

We thank Sandrine Machetti (Inserm U895, Nice) for helpful discussions. We are grateful to Mireille Mari for her excellent technical assistance. We acknowledge Pr Sylvie Chollet-Martin for providing us the PLB-985 cell line.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: A. Chargui PN XH PH BM VVC. Performed the experiments: A. Chargui A. Cesaro SM MF. Analyzed the data: A. Chargui PB PH BM VVC. Contributed reagents/materials/analysis tools: ADM. Wrote the paper: PH BM VVC.

in intestinal epithelial cells in response to neutrophil transepithelial migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G32–42.

- von Gunten S, Yousefi S, Seitz M, Jakob SM, Schaffner T, et al. (2005) Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment. *Blood* 106: 1423–1431.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, et al. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535.

5. Mihalache CC, Yousefi S, Conus S, Villiger PM, Schneider EM, et al. (2011) Inflammation-associated autophagy-related programmed necrotic death of human neutrophils characterized by organelle fusion events. *J Immunol* 186: 6532–6542.
6. Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A (2011) Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 12: 99–113.
7. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A (1999) Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 67: 4499–4509.
8. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, et al. (2001) Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* 69: 5529–5537.
9. Kumar Y, Valdivia RH (2009) Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe* 5: 593–601.
10. Raso T, Crivellaro S, Chirillo MG, Pais P, Gaia E, et al. (2011) Analysis of *Escherichia coli* isolated from patients affected by Crohn's disease. *Curr Microbiol* 63: 131–137.
11. Campoy E, Colombo MI (2009) Autophagy in intracellular bacterial infection. *Biochim Biophys Acta* 1793: 1465–1477.
12. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, et al. (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4: 151–175.
13. Levine B (2005) Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120: 159–162.
14. Panyasiravanit M, Greenwood MP, Murphy D, Isidoro C, Auewarakul P, et al. (2011) Induced autophagy reduces virus output in dengue infected monocytic cells. *Virology* 418: 74–84.
15. Lapaquette P, Bringer MA, Darfeuille-Michaud A (2012) Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol*: [Epub ahead of print].
16. Pujol C, Klein KA, Romanov GA, Palmer LE, Citroa C, et al. (2009) *Yersinia pestis* can reside in autophagosomes and avoid xenophagy in murine macrophages by preventing vacuole acidification. *Infect Immun* 77: 2251–2261.
17. Hausmann M (2010) How bacteria-induced apoptosis of intestinal epithelial cells contributes to mucosal inflammation. *Int J Inflamm*: 574568.
18. Hofman P, D'Andrea L, Carnes D, Colgan SP, Madara JL (1996) Intestinal epithelial cytoskeleton selectively constrains lumen-to-tissue migration of neutrophils. *Am J Physiol* 271: C312–320.
19. Tucker KA, Lilly MB, Heck L, Rado TA (1987) Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* 70: 372–378.
20. Semiramo N, Gleizes A, Turbica I, Sandre C, Gorges R, et al. (2009) *Escherichia coli* type 1 pili trigger late IL-8 production by neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through a Src family kinase- and MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 85: 310–321.
21. Pedruzzi E, Fay M, Elbim C, Gaudry M, Gougerot-Pocidalo MA (2002) Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 117: 719–726.
22. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, et al. (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115: 1405–1413.
23. Brest P, Corcelle EA, Cesaro A, Chargui A, Belaid A, et al. (2010) Autophagy and Crohn's disease: at the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer. *Curr Mol Med* 10: 486–502.
24. Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E (2005) Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 1: 84–91.
25. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, et al. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171: 603–614.
26. Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, et al. (2005) Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 307: 727–731.
27. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, et al. (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119: 753–766.
28. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, et al. (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450: 1253–1257.
29. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, et al. (2008) Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature* 456: 264–268.
30. Bhavsar AP, Guttman JA, Finlay BB (2007) Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature* 449: 827–834.
31. Lamkanfi M, Dixit VM (2010) Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe* 8: 44–54.
32. Chen Y, Klionsky DJ (2011) The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci* 124: 161–170.
33. Biswas D, Qureshi OS, Lee WY, Croudace JE, Mura M, et al. (2008) ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunol* 9: 35.
34. Py BF, Lipinski MM, Yuan J (2007) Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy* 3: 117–125.
35. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V (2006) Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313: 1438–1441.
36. Hofman PM (2010) Pathobiology of the neutrophil-intestinal epithelial cell interaction: role in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 16: 5790–5800.
37. Maiani NA, Roos D, Kuijpers TW (2003) Tumor necrosis factor induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood* 101: 1987–1995.
38. Malcolm ID, Flegel KM, Katz M (1979) Vacuolization of the neutrophil in bacteremia. *Arch Intern Med* 139: 675–676.
39. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, et al. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176: 231–241.
40. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, et al. (2011) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* 21: 290–304.
41. Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Skendros P, Apostolidou E, et al. (2011) Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 $\beta$  and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One* 6: e29318.
42. Deretic V, Levine B (2009) Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 5: 527–549.
43. Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Kronke M, et al. (2007) *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J Biol Chem* 282: 2695–2706.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ng, S. C. *et al.* Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-pacific Crohn's and colitis epidemiology study. *Gastroenterology* **145**, 158–165.e2 (2013).
2. Koutsounas, I. *et al.* First diagnosis of inflammatory bowel disease in a 91-year-old man. *Case Rep. Gastroenterol.* **6**, 790–6 (2012).
3. Molodecky, N. a *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**, 46–54.e42; quiz e30 (2012).
4. Burisch, J. & Munkholm, P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **29**, 357–62 (2013).
5. Nerich, V. *et al.* Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm. Bowel Dis.* **12**, 218–26 (2006).
6. Cosnes, J. *et al.* Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**, 1785–94 (2011).
7. Jess, T. *et al.* Disease concordance, zygosity, and NOD2/CARD15 status: follow-up of a population-based cohort of Danish twins with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **100**, 2486–92 (2005).
8. Bonen, D. K. & Cho, J. H. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **124**, 521–36 (2003).
9. Actis, G. C. & Rosina, F. Inflammatory bowel disease: An archetype disorder of outer environment sensor systems. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **4**, 41–6 (2013).
10. Hampe, J. *et al.* Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **357**, 1925–8 (2001).
11. Hampe, J. *et al.* Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 321–6 (2002).
12. Thomas, A. & Manolio, A. How to interpret a Genome-wide Association Study. *JAMA* **11**, 1335-1344 (2008).
13. Manolio, TA. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *N engl J Med* **363**, 166-76 (2013).
14. Nachman, M. W. Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans. *Trends Genet.* **17**, 481–5 (2001).
15. Economou, M. *et al.* Differential Effects of NOD2 Variants on Crohn's Disease Risk and Phenotype in Diverse Populations:A Metaanalysis. *Am J Gastroenterol.* **99**, 2393–2404 (2004).
16. Barrett, JC. Genome-wide association defines more than thirty distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* **8**, 955-962 (2008).

17. Weersma, R. K. *et al.* ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 621–7 (2008).
18. Girardin, S. E. *et al.* Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**, 1584–7 (2003).
19. Girardin, S. E. *et al.* Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *J. Biol. Chem.* **278**, 8869–8872 (2003).
20. Hugot, J. P. *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599–603 (2001).
21. Ogura, Y. *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 603–6 (2001).
22. Zhernakova, A. *et al.* Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 1202–10 (2008).
23. Gross, O. *et al.* Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**, 651–6 (2006).
24. Duerr, R. H. *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461–3 (2006).
25. Hisamatsu, T. *et al.* Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol. Ther.* **137**, 283–97 (2013).
26. Glocker, E.-O. *et al.* Infant colitis--it's in the genes. *Lancet* **376**, 1272 (2010).
27. Kotlarz, D. *et al.* Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* **143**, 347–55 (2012).
28. Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **474**, 307–17 (2011).
29. Powell, J. J. *et al.* Immune potentiation of ultrafine dietary particles in normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *J. Autoimmun.* **14**, 99–105 (2000).
30. Ananthakrishnan, A. N. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)* **9**, 367–74 (2013).
31. Wild, G. E., Drozdowski, L., Tartaglia, C., Clandinin, M. T. & Thomson, A. B. R. Nutritional modulation of the inflammatory response in inflammatory bowel disease--from the molecular to the integrative to the clinical. *World J. Gastroenterol.* **13**, 1–7 (2007).
32. Kaplan, G. G. *et al.* The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 2925–31 (2008).
33. Lerebours, E. *et al.* Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study. *Am. J. Gastroenterol.* **102**, 122–31 (2007).
34. Wang, S.-L. *et al.* Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp. Ther. Med.* **4**, 1051–1056 (2012).

35. Bäckhed, F. *et al.* Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915–20 (2005).
36. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–84 (2010).
37. Liu, P. T. *et al.* Therapeutic implications of the TLR and VDR partnership. *Trends Mol. Med.* **13**, 117–24 (2007).
38. Cario, E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 1583–97 (2010).
39. Cario, E. & Podolsky, D. K. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* **68**, 7010–7 (2000).
40. Hausmann, M. *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* **122**, 1987–2000 (2002).
41. Vijay-kumar, M. *et al.* Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* **117**, 3909–3921 (2007).
42. Sitaraman, S. V *et al.* Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **288**, G403–6 (2005).
43. Meylan, E. *et al.* Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39–44 (2006).
44. Franchi, L. *et al.* Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense. *Immunol Rev* **227**, 106–128 (2009).
45. Engelhardt, K. R. & Grimbacher, B. Mendelian traits causing susceptibility to mucocutaneous fungal infections in human subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 294–305 (2012).
46. Cerf-Bensussan, N. & Gaboriau-Routhiau, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 735–44 (2010).
47. Hooper, L. V, *et al.* Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* **336**, 1268–73 (2012).
48. Eckburg, P. B. & Relman, D. A. The Role of Microbes in Crohn ' s Disease. *Clin Infect Dis.* **44**, 256–262 (2007).
49. Dianda, L. *et al.* Short Communication T Cell Receptor- $\alpha$ 3-Deficient Mice Fail to Environment. *Am J Pathol.* **150**, 91–97 (1997).
50. Balish, E. & Warner, T. Enterococcus faecalis induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *Am. J. Pathol.* **160**, 2253–7 (2002).
51. Burich, A. *et al.* Helicobacter -induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice Helicobacter -induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281** G764-778 (2013).
52. Kullberg, M. C. *et al.* Helicobacter hepaticus triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect. Immun.* **66**, 5157–66 (1998).
53. Blumberg, R. & Powrie, F. Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey. *Sci. Transl. Med.* **4**, 137rv7 (2012).

54. Sellon, R. K. *et al.* Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* **66**, 5224–31 (1998).
55. Peloquin, J. M. & Nguyen, D. D. The microbiota and inflammatory bowel disease: Insights from animal models. *Anaerobe* **2–6** (2013).
56. Hoentjen, F. *et al.* Antibiotics with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut* **52**, 1721–7 (2003).
57. Davis, W. C. & Madsen-Bouterse, S. a. Crohn's disease and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: the need for a study is long overdue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **145**, 1–6 (2012).
58. Selby, W. *et al.* Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* **132**, 2313–9 (2007).
59. Chacon, O., Bermudez, L. E. & Barletta, R. G. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and Mycobacterium paratuberculosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 329–63 (2004).
60. Zippi, M. *et al.* Mesenteric adenitis caused by Yersinia pseudotuberculosis in a patient subsequently diagnosed with Crohn ' s disease of the terminal ileum. *World J gastroenterol* **12**, 3933–3935 (2006).
61. Knösel, T., *et al.* Prevalence of infectious pathogens in Crohn's disease. *Pathol. Res. Pract.* **205**, 223–30 (2009).
62. Hugot, J.-P., *et al.* Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* **362**, 2012–5 (2003).
63. Chen, W. *et al.* Detection of Listeria monocytogenes by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **15**, 1145–1150 (2000).
64. Müller, S. *et al.* Serological and DNA-based evaluation of Chlamydia pneumoniae infection in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 889–94 (2006).
65. Boorom, K. F. Is this recently characterized gastrointestinal pathogen responsible for rising rates of inflammatory bowel disease (IBD) and IBD associated autism in Europe and the United States in the 1990s? *Med. Hypotheses* **69**, 652–9 (2007).
66. Radhakrishnan, P. *et al.* Altered expression of MUC2 and MUC5AC in response to Shigella infection, an in vivo study. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 884–9 (2007).
67. Hansen, R. *et al.* Could Helicobacter organisms cause inflammatory bowel disease? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **61**, 1–14 (2011).
68. Martin, H. M. *et al.* Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**, 80–93 (2004).
69. Baumgart, M. *et al.* Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive Escherichia coli of novel phylogeny relative to



- depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J.* **1**, 403–18 (2007).
70. Darfeuille-Michaud, A. *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**, 412–421 (2004).
  71. Chassaing, B. & Darfeuille-Michaud, A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**, 1720–28 (2011).
  72. Feeney, M. *et al.* A case-control study of measles vaccination and inflammatory bowel disease. *Lancet* **350**, 764–766 (1997).
  73. Yanai, H., *et al.* Epstein-Barr virus infection of the colon with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **94**, 1582–6 (1999).
  74. Kandiel, A. & Lashner, B. Cytomegalovirus colitis complicating inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 2857–65 (2006).
  75. Main, J. *et al.* Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* ( bakers ' yeast ) in Crohn ' s disease Rupture of tendon after cryotherapy for hand wart. *BMJ* **297**, 1105–1106 (1988).
  76. Standaert-Vitse, A. *et al.* *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody markers of Crohn's disease. *Gastroenterology* **130**, 1764–75 (2006).
  77. Khan, W. I. *et al.* Intestinal Nematode Infection Ameliorates Experimental Colitis in Mice. *Infect Immun* **70**, 5931–5937 (2002).
  78. Konturek , P. C. *et al.* Stress in the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J Physiol Pharmacol* **6**, 591–599 (2011).
  79. Jostins, L., *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* **491**, 119–124 (2013).
  80. Akira, S., *et al.* Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
  81. Clarke, T. B. & Weiser, J. N. Intracellular sensors of extracellular bacteria. *Immunol. Rev.* **243**, 9–25 (2011).
  82. Korn, T., *et al.* IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485–517 (2009).
  83. Geremia, A. *et al.* Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* (2013). doi:10.1016/j.autrev.2013.06.004
  84. Roda, G. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* **16**, 4264 (2010).
  85. Zhao, C., *et al.* Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Letters* **396**, 319–322 (1996).
  86. Zasloff, M. antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* **415**, 389–395 (2002).
  87. Abreu, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 131–44 (2010).

88. Mizushima, N., *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion *Nature*. **451**, 1069–1075 (2008).
89. Geremia, A., *et al.* Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* doi:10.1016/j.autrev.2013.06.004
90. Simon, M. C. & Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 285–96 (2008).
91. Ozaki, H. *et al.* Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 182–9 (1999).
92. Furuta, G. T. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J. Exp. Med.* **193**, 1027–34 (2001).
93. Colgan, S. P. & Taylor, C. T. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 281–7 (2010).
94. Wang, GL *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodim. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 5510-5514 (1995)
95. Wang, G. L. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5510–4 (1995).
96. Gu, Y. Z., *et al.* The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 519–61 (2000).
97. Bárdos, J. I. & Ashcroft, M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim. Biophys. Acta* **1755**, 107–20 (2005).
98. Keith, B., *et al.* Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6692–7 (2001).
99. Bunger, M. K. *et al.* Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**, 1009–17 (2000).
100. Kaelin, W. G. Proline hydroxylation and gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 115–28 (2005).
101. Ke, Q., *et al.* Fluorescent tracking of nickel ions in human cultured cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **219**, 18–23 (2007).
102. Nguyen, L. K. *et al.* A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) network. *J. Cell Sci.* **126**, 1454–63 (2013).
103. Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 343–54 (2004).
104. Ebert, B. L. & Bunn, H. F. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4089–96 (1998).
105. Qian, D. Z. *et al.* Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Cancer Res.* **66**, 8814–21 (2006).

106. Carrero, P. *et al.* Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 402–15 (2000).
107. Dayan, F. *et al.* The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res.* **66**, 3688–98 (2006).
108. Isaacs, J. S. *et al.* Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 29936–44 (2002).
109. Fukuda, R. *et al.* Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 38205–11 (2002).
110. Kietzmann, T. & Görlach, A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 474–86 (2005).
111. Pagé, E. L., *et al.* Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J. Biol. Chem.* **277**, 48403–9 (2002).
112. Brüne, B. & Zhou, J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovasc. Res.* **75**, 275–82 (2007).
113. Masson, N. *et al.* The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. *EMBO Rep.* **13**, 251–7 (2012).
114. Hagen, T. Oxygen versus Reactive Oxygen in the Regulation of HIF-1 $\alpha$ : The Balance Tips. *Biochem. Res. Int.* **2012**, 436981 (2012).
115. Li, Z., *et al.* VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1alpha. *EMBO Rep.* **6**, 373–8 (2005).
116. Gill, G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* **18**, 2046–59 (2004).
117. Bae, S.-H. *et al.* Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 394–400 (2004).
118. Chen, L. *et al.* Mammalian tumor suppressor Int6 specifically targets hypoxia inducible factor 2 alpha for degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation. *J. Biol. Chem.* **282**, 12707–16 (2007).
119. Hess, D. T. *et al.* Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150–66 (2005).
120. Semenza, G. L. & Liu, Y. RACK1 vs. HSP90 Competition for HIF-1 $\alpha$  Degradation vs. Stabilization. *Cell Cycle*. **6**, 656–659 (2007).
121. Thomas, D. D. *et al.* The Chemical Biology of Nitric Oxide. Implications in Cellular Signaling. *Free Radic Biol Med.* **45**, 18–31 (2009).
122. Hagen, T., *et al.* Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science*. **302**, 1975–8 (2003).
123. Wang, F. *et al.* HIF-1alpha-prolyl hydroxylase: molecular target of nitric oxide in the hypoxic signal transduction pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 657–62 (2002).

124. Yasinska, I. M. & Sumbayev, V. V. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 $\alpha$  protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* **549**, 105–109 (2003).
125. Park, Y. *et al.* Nitric Oxide Donor , (  $\uparrow$  ) - S -Nitroso- N -acetylpenicillamine , Stabilizes Transactive Hypoxia-Inducible Factor-1  $\alpha$  by Inhibiting von Hippel-Lindau Recruitment and Asparagine Hydroxylation .*Mol Pharmacol* **401**, 236–245 (2008).
126. Hellwig-bürgel, T. *et al.* Interleukin-1  $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\gamma$  Stimulate DNA Binding of Hypoxia-Inducible Factor-1. *Blood* **92**, 1561–1567 (2013).
127. Albina, J. E. *et al.* HIF-1 expression in healing wounds : HIF-1  $\alpha$  induction in primary inflammatory cells by TNF-  $\alpha$  *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1971-7(2013).
128. De Ponti, C. *et al.* Adenosine A2a receptor-mediated, normoxic induction of HIF-1 through PKC and PI-3K-dependent pathways in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 392–402 (2007).
129. Cramer, T. *et al.* HIF-1 $\alpha$  Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation. *Cell* **112**, 645–657 (2003).
130. Peyssonnaud, C. *et al.* HIF-1  $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* **115**, 1806-1815 (2005).
131. Kempf, V. a *et al.* Evidence of a leading role for VEGF in Bartonella henselae-induced endothelial cell proliferations. *Cell. Microbiol.* **3**, 623–32 (2001).
132. Hartmann, H. *et al.* Hypoxia-independent activation of HIF-1 by enterobacteriaceae and their siderophores. *Gastroenterology* **134**, 756–67 (2008).
133. Yeo, M. *et al.* Novel action of gastric proton pump inhibitor on suppression of Helicobacter pylori induced angiogenesis. *Gut* **55**, 26–33 (2006).
134. Cane, G. *et al.* HIF-1 $\alpha$  mediates the induction of IL-8 and VEGF expression on infection with Afa/Dr diffusely adhering E. coli and promotes EMT-like behaviour. *Cell. Microbiol.* **12**, 640–53 (2010).
135. Blouin, C. C., *et al* Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Blood* **103**, 1124–30 (2004).
136. Frede, S., *et al* Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44 / 42 MAPK and NF-  $\kappa$  B. *Biochem J* **527**, 517–527 (2006).
137. Wen, H. & Ting, J. P.-Y. Agitation by suffocation: how hypoxia activates innate immunity via the Warburg effect. *Cell Metab.* **17**, 814–5 (2013).
138. Hwang, I. I. L. *et al.* Loss of VHL confers hypoxia-inducible factor (HIF)-dependent resistance to vesicular stomatitis virus: role of HIF in antiviral response. *J. Virol.* **80**, 10712–23 (2006).
139. Wakisaka, N. *et al.* Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Synthesis of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell Biol* **24**, 5223–5234 (2004).
140. Yoo, Y.-G. *et al* The carboxy-terminus of the hepatitis B virus X protein is necessary and sufficient for the activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *FEBS Lett.* **577**, 121–6 (2004).

141. Benita, Y. *et al.* An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 ( HIF-1 ) -target genes that form the core response to hypoxia. **37**, 4587–4602 (2009).
142. Karhausen, J. *et al.* Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. **114**, (2004).
143. Giatromanolaki, a *et al.* Hypoxia inducible factor 1alpha and 2alpha overexpression in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Pathol.* **56**, 209–13 (2003).
144. Kempf, V. A. J. *et al.* Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacillary Angiomatosis Evidence for a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacterial Infections. *Circulation.* **111**, 1054-1062 (2005).
145. Cummins, E. P. *et al.* The hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine is protective in a murine model of colitis. *Gastroenterology* **134**, 156–65 (2008).
146. Robinson, A. *et al.* Mucosal Protection by Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Prolyl Hydroxylase Inhibition. *Gastroenterology.* **134**, 145–155 (2008).
147. Hirota, S. A. *et al.* Hypoxia-inducible factor signaling provides protection in Clostridium difficile-induced intestinal injury *Gastroenterology.* **139**, 1–19 (2011).
148. Comerford, K. M. *et al.* Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance ( MDR1 ) Gene Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance. *Cancer Res* **62**, 3387–3394 (2002).
149. Synnestvedt, K. *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J clin Invest.* **110**, 993–1002 (2002).
150. Grivennikov, S. I. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin. Immunopathol.* **35**, 229–44 (2013).
151. Xue, X. & Shah, Y. M. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  is essential in activating the COX2/mPGES-1/PGE2 signaling axis in colon cancer. *Carcinogenesis* **34**, 163–9 (2013).
152. Stein, J., Hartmann, F. & Dignass, A. U. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 599–610 (2010).
153. Peyssonnaud, C. *et al.* Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors ( HIFs ). *J Clin Invest.* **117**, 1926-1932 (2007).
154. Mastrogiannaki, M. *et al.* The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions. *Blood* **122**, 885–92 (2013).
155. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 401–10 (2003).
156. Smith, L. E. *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat. Med.* **5**, 1390–5 (1999).
157. Tracy, K. *et al.* BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6229–42 (2007).
158. Webster, K. a, Graham, R. M. & Bishopric, N. H. BNip3 and signal-specific programmed death in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**, 35–45 (2005).

159. Maiuri, M. C. *et al.* Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* **26**, 2527–39 (2007).
160. Bellot, G. *et al.* Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2570–81 (2009).
161. Croxen, M. a & Finlay, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 26–38 (2010).
162. Kaper, J. B. *et al.* Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–40 (2004).
163. Law, R. J. *et al.* In vitro and in vivo model systems for studying enteropathogenic *Escherichia coli* infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, a009977 (2013).
164. Clements, A. *et al.* Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes.* **3** 71–87 (2012).
165. Burke, D.A.& Axon, A.T.R. Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea. *BMJ.* **297**, 102–104 (1988).
166. Darfeuille-michaud, A. Mini-Review Adherent-invasive *Escherichia coli* : a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn ' s disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **193**, 185-193 (2002).
167. Boudeau, J. *et al.* Invasive Ability of an *Escherichia coli* Strain Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn ' s Disease. *Infection And Immunity.* **67**, 4499–4509 (1999).
168. Rolhion, N., *et al.* Strong Decrease in Invasive Ability and Outer Membrane Vesicle Release in Crohn ' s Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Strain LF82 with the *yfgL* Gene Deleted. *J Bacteriol.* **187**, 2286–2296 (2005).
169. Glasser, A. *et al.* Adherent Invasive *Escherichia coli* Strains from Patients with Crohn ' s Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death. *Infect Immun.* **69**, 5529–5537 (2001).
170. Barnich, N. *et al.* Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol. Microbiol.* **48**, 781–794 (2003).
171. Chargui, A. *et al.* Subversion of autophagy in adherent invasive *Escherichia coli*-infected neutrophils induces inflammation and cell death. *PLoS One* **7**, e51727 (2012).
172. Rolhion, N. *et al.* *OmpC* and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol. Microbiol.* **63**, 1684–700 (2007).
173. Abraham, C. & Cho, J. H. clinical implications of basic research Bugging of the Intestinal Mucosa. *N Engl J Med.* **357**, 6–8 (2007).
174. Lodes, M. J. *et al.* Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J. Clin Invest.* **113**, 1296-1306 (2004).
175. Guerry, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* **15**, 456–61 (2007).

176. Rhee, S. H. *et al.* Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13610–5 (2005).
177. Madrazo, D. R. *et al.* Signaling via Toll-Like Receptor 5 Can Initiate Inflammatory Mediator Production by Murine Osteoblasts Signaling via Toll-Like Receptor 5 Can Initiate Inflammatory Mediator Production by Murine Osteoblasts. *Infect Immun.* **71**, 5418–5421 (2003).
178. Wine, E. *et al.* Adherent-invasive Escherichia coli, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol.* **9**, 180 (2009).
179. Sasaki, M. *et al.* Invasive Escherichia coli are a feature of Crohn's disease. *Lab. Invest.* **87**, 1042–54 (2007).
180. Bringer, M.-A. *et al.* The Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell. Microbiol.* **8**, 471–84 (2006).
181. Gentry, M. *et al.* Role of primary human alveolar epithelial cells in host defense against Francisella tularensis infection. *Infect. Immun.* **75**, 3969–78 (2007).
182. Napoli, I. & Neumann, H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* **158**, 1030–8 (2009).
183. Erwig, L.-P. & Henson, P. M. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am. J. Pathol.* **171**, 2–8 (2007).
184. Deretic, V., Saitoh, T. & Akira, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 722–737 (2013).
185. Cough, P.J. & Gordon, S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes and Infection.* **2**, 305–311 (2000).
186. Takahashi, K. *et al.* A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J. Exp. Med.* **204**, 2963–76 (2007).
187. Botelho, R. J. & Grinstein, S. Phagocytosis. *Curr. Biol.* **21**, R533–8 (2011).
188. Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1102–9 (2007).
189. Dice, J. F. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **4**, 295–299 (2007).
190. Massey, A. *et al.* Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2420–34 (2004).
191. Wada, Y. *et al.* Microautophagy in the visceral endoderm is essential for mouse early development. *Autophagy* **9**, 252–4 (2013).
192. Ohsumi, Y. & Mizushima, N. Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 231–236 (2004).
193. Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy : selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab.* **21**, 142–150 (2011).
194. Ding, W.X. & Yin, X.M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem.* **393**, 547–564 (2013).
195. Williams, C. & van der Klei, I. J. Pexophagy-linked degradation of the peroxisomal membrane protein Pex3p involves the ubiquitin-proteasome system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 395–401 (2013).

196. Russell, R. C. *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* **15**, 741–50 (2013).
197. Tanida, I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal* **14**, 2201–14 (2011).
- 1793, 1496–1507 (2010).
198. Longatti, A. & Tooze, S. a. Recycling endosomes contribute to autophagosome formation. *Autophagy* **8**, 1682–3 (2012).
199. Magister, S. & Kos, J. Cystatins in immune system. *J Cancer* **4**, 45–56 (2013).
200. Yoshimori, T. *et al.* Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 17707–12 (1991).
201. Yamamoto, a *et al.* Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* **23**, 33–42 (1998).
202. Muench, S. P. *et al.* Cryo-electron Microscopy of the Vacuolar ATPase Motor Reveals its Mechanical and Regulatory Complexity. *J. Mol. Biol.* **386**, 989–999 (2009).
203. Zhang, Z. *et al.* Structure of the yeast vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* **283**, 35983–95 (2008).
204. Into, T. *et al.* Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. *Cell. Signal.* **24**, 1150–62 (2012).
205. Grégoire, I. P. *et al.* Autophagie et pathogènes. *médecine/sciences* **27**, 41–7 (2011).
206. Kuballa, P. *et al.* Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One* **3**, e3391 (2008).
207. Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**, 323–35 (2011).
208. Ramjeet, M. *et al.* “Nodophagy”: New crossroads in Crohn disease pathogenesis. *Gut Microbes* **1**, 307–315 (2010).
209. Fujita, N. *et al.* Differential involvement of Atg16L1 in Crohn disease and canonical autophagy: analysis of the organization of the Atg16L1 complex in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **284**, 32602–9 (2009).
210. Billmann-Born, S. *et al.* The complex interplay of NOD-like receptors and the autophagy machinery in the pathophysiology of Crohn disease. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 593–602 (2011).
211. Shi, J. *et al.* Cleavage of sequestosome 1/p62 by an enteroviral protease results in disrupted selective autophagy and impaired NFκB signaling. *Autophagy* **9**, 1–13 (2013).
212. Bloor, S. *et al.* Article LC3C , Bound Selectively by a Noncanonical LIR Motif in NDP52 , Is Required for Antibacterial Autophagy. **62**, 329–342 (2012).
213. Birgisdottir, A. B. *et al.* The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J. Cell Sci.* **126**, 3237–47 (2013).



214. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–45 (2007).
215. Komatsu, M. *et al.* Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**, 1149–63 (2007).
216. Perrin, A. J. *et al.* Recognition of Bacteria in the Cytosol of Mammalian Cells by the Ubiquitin System. *Current Biology*. **14**, 806–811 (2004).
217. Birmingham, C. L. & Brumell, Autophagy recognizes intracellular Salmonella enterica serovar Typhimurium in damaged vacuoles. *Autophagy*. **2**, 156–158 (2006).
218. Fujita, N. & Yoshimori, T. Ubiquitination-mediated autophagy against invading bacteria. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 492–7 (2011).
219. Shahnazari, S. *et al.* A diacylglycerol-dependent signaling pathway contributes to regulation of antibacterial autophagy. *Cell Host Microbe* **8**, 137–46 (2010).
220. Thurston, T. L. M. *et al.* The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* **10**, 1215–21 (2009).
221. Cemma, M., Kim, P. K. & Brumell, J. H. The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target Salmonella to the autophagy pathway. *Autophagy* **7**, 341–345 (2011).
222. Kirkin, V. *et al.* NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* **5**, 732–733 (2009).
223. Ogawa, M. & Sasakawa, C. Shigella and Autophagy. *Autophagy* **3**, 171–174 (2006).
224. Lerena, M. C. *et al.* Bacterial pathogens and the autophagic response. *Cell. Microbiol.* **12**, 10–8 (2010).
225. Lai, S. & Devenish, R. J. LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. *Cells* **1**, 396–408 (2012).
226. Deretic, V. & Levine, B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations *Cell Host Microbe* **5**, 527–549 (2009).
227. Ogawa, M. *et al.* Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* **307**, 727–31 (2005).
228. Jo, E.-K. *et al.* Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. *Front. Immunol.* **4**, 97 (2013).
229. Shin, D.-M. *et al.* Mycobacterium tuberculosis eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog.* **6**, e1001230 (2010).
230. Butchar, J. P. *et al.* Microarray Analysis of Human Monocytes Infected with Francisella tularensis Identifies New Targets of Host Response Subversion. *PLoS One* **3**, 1–8 (2008).
231. Deretic, V. & Levine, B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* **5**, 527–49 (2009).

232. Pujol, C. *et al.* Yersinia pestis can reside in autophagosomes and avoid xenophagy in murine macrophages by preventing vacuole acidification. *Infect. Immun.* **77**, 2251–61 (2009).
233. Moreau, K. *et al.* Autophagosomes can support Yersinia pseudotuberculosis replication in macrophages. *Cell. Microbiol.* **12**, 1108–23 (2010).
234. Delgado, M. a, Elmaoued, R. a, Davis, A. S., Kyei, G. & Deretic, V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* **27**, 1110–21 (2008).
235. Meyer-Morse, N. *et al.* Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during Listeria monocytogenes infection. *PLoS One* **5**, e8610 (2010).
236. Packey, C. D. & Sartor, R. B. Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *J. Intern. Med.* **263**, 597–606 (2008).
237. Michaud, A. D. *et al.* Presence of Adherent *E.coli* strains in ileal mucosa of patients with CD. *Gastroenterology*. **115**, 1405–1413 (1998).
238. Nash, J. H. *et al.* Genome sequence of adherent-invasive Escherichia coli and comparative genomic analysis with other E. coli pathotypes. *BMC Genomics* **11**, 667 (2010).
239. Rolhion, N. *et al.* Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive Escherichia coli invasion. *Gut* **59**, 1355–62 (2010).
240. Carvalho, F. a *et al.* Crohn's disease adherent-invasive Escherichia coli colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* **206**, 2179–89 (2009).
241. Caprilli, R. Why does Crohn's disease usually occur in terminal ileum? *J. Crohns. Colitis* **2**, 352–6 (2008).
242. Eaves-Pyles, T. *et al.* Escherichia coli isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 397–409 (2008).
243. Danese, S. & Mantovani, a. Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene* **29**, 3313–23 (2010).
244. Zhao, Q. *et al.* Mice with increased angiogenesis and osteogenesis due to conditional activation of HIF pathway in osteoblasts are protected from ovariectomy induced bone loss. *Bone* **50**, 763–70 (2012).
245. Cai, Q. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent protein LANA interacts with HIF-1 alpha to upregulate RTA expression during hypoxia: Latency control under low oxygen conditions. *J. Virol.* **80**, 7965–75 (2006).
246. Bayele, H. K. *et al.* HIF-1 regulates heritable variation and allele expression phenotypes of the macrophage immune response gene SLC11A1 from a Z-DNA – forming microsatellite. *Blood* **110**, 3039–3048 (2007).
247. Zinkernagel, A. S., Peyssonnaud, C., Johnson, R. S. & Nizet, V. Pharmacologic augmentation of hypoxia-inducible factor-1alpha with mimosine boosts the bactericidal capacity of phagocytes. *J. Infect. Dis.* **197**, 214–7 (2008).

248. Kempf, V. a J. *et al.* Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation* **111**, 1054–62 (2005).
249. Carvalho, F. a *et al.* Crohn's disease adherent-invasive Escherichia coli colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* **206**, 2179–89 (2009).
250. Andersen-Nissen, E. *et al.* Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9247–52 (2005).
251. Terron-Exposito, R. *et al.* Antibodies against Marinobacter algicola and Salmonella typhimurium flagellins do not cross-neutralize TLR5 activation. *PLoS One* **7**, e48466 (2012).
252. Van Uden, P., Kenneth, N. S. & Rocha, S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by NF-kappaB. *Biochem. J.* **412**, 477–84 (2008).
253. Jung, Y. *et al.* IL-1  $\beta$  mediated up-regulation of HIF-1  $\alpha$  via an NFkB/COX- 2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* **17**, 2115-7 (2003).
254. Bracken, C. P. *et al.* Activity of hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  is regulated by association with the NF-kappaB essential modulator. *J. Biol. Chem.* **280**, 14240–51 (2005).
255. Kodama, M. *et al.* Histological characteristics of gastric mucosa prior to Helicobacter pylori eradication may predict gastric cancer. *Scand. J. Gastroenterol.* 1–8 (2013).
256. Jo, E.-K. *et al.* Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. *Front. Immunol.* **4**, 97 (2013).
257. Brest, P., *et al.* Risk predisposition for Crohn disease: A “ménage à trois” combining IRGM allele, miRNA and xenophagy. *Autophagy* **7**, 786–787 (2011).
258. Jain, K., *et al.* Autophagy in breast cancer and its implications for therapy. *Am. J. Cancer Res.* **3**, 251–65 (2013).
259. Mimouna, S., *et al.* Crohn disease-associated Escherichia coli by activation of HIF-dependent responses. *Gut Microbes.* **6**, 335–346 (2011).
260. Glasser, A. *et al.* Impaired autophagy in Crohn's disease patients: an opened gate to invasive bacteria? *Med Sci (Paris)* **25**, 349-351(2009).
261. Ogawa, M. & Sasakawa, C. Bacterial evasion of the autophagic defense system. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 62–8 (2006).
262. Deretic, V. & Levine, B. Autophagy, immunity and microbial adaptations. *Cell Host Microbe.* **5**, 527–549 (2009).
263. Burich, A. *et al.* Helicobacter -induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice Helicobacter -induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **3**, 764-78 (2013).
264. Brigotti, M. *et al.* Identification of TLR4 as the Receptor That Recognizes Shiga Toxins in Human Neutrophils. *J. Immunol.* **9**, 4748-58 (2013).
265. Tolman, JS. & Valvano, MA. Global changes in gene expression by the opportunistic pathogen Burkholderia cenocepacia in response to internalization by murine macrophages. *BMC Genomics.* **9**, 13–63 (2012).

266. Ashida, H. *et al.* Shigella are versatile mucosal pathogens that circumvent the host innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 448–55 (2011).
267. Reinheckel, T. *et al.* The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. *J. Cell Sci.* **118**, 3387–95 (2005).
268. Hagemann, S. *et al.* The human cysteine protease cathepsin V can compensate for murine cathepsin L in mouse epidermis and hair follicles. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 775–80 (2004).
269. Menacho-Márquez, M. *et al.* The Rho exchange factors Vav2 and Vav3 favor skin tumor initiation and promotion by engaging extracellular signaling loops. *PLoS Biol.* **11**, e1001615 (2013).
270. Giaffer, M. H. *et al.* Virulence properties of Escherichia coli strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **33**, 646–50 (1992).
271. Keighley, M. R. *et al.* Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut* **19**, 1099–104 (1978).
272. Manichanh, C. *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**, 205–11 (2006).
273. Neut, C. *et al.* Changes in the Bacterial Flora of the Neoterminal Ileum After Ileocolonic Resection for Crohn ' s Disease. *Am J Gastroenterol.* **97**, 939-946 (2002).
274. Swidsinski, A. *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**, 44–54 (2002).
275. Sokol, H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16731–6 (2008).
276. Tamboli, C. P. *et al.* Dysbiosis as a prerequisite for IBD. *Gut* **53**, 1057 (2004).
277. Hausmann, M. *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* **122**, 1987–2000 (2002).
278. Barnich, N. & Darfeuille-michaud, A. Adherent-invasive Escherichia coli and Crohn ' s disease. *Curr Opinion Gastroenterol* **23**, 16–20 (2007).
279. Budarf, M. L. *et al.* GWA studies: rewriting the story of IBD. *Trends Genet.* **25**, 137–46 (2009).
280. Barnich, N. & Darfeuille-michaud, A. Adherent-invasive Escherichia coli and Crohn ' s disease. *Curr Opinion Gastroenterol* **23**, 16–20 (2007).
281. Nash, J. H. *et al.* Genome sequence of adherent-invasive Escherichia coli and comparative genomic analysis with other E. coli pathotypes. *BMC Genomics* **11**, 667 (2010).
282. Wiesener, M. S. *et al.* Widespread, hypoxia-inducible expression of HIF-2  $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* **2**, 271-3(2002).
283. Frede, S. *et al.* Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem. J.* **396**, 517–27 (2006).

284. Tan, et al. High-density lipoproteins augment hypoxia-induced angiogenesis via regulation of post-translational modulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *FASEB J.* **396**, 517–27 (2006).